

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

MESURE DU FLOT SANGUIN DANS LE TISSU ADIPEUX : IMPLANTATION ET MISE AU
POINT DE LA MÉTHODE À SHERBROOKE

par

Elizabeth Martin

Département de physiologie et biophysique, Service d'Endocrinologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)

Juin 2009

Évaluateurs

Jean-Luc Ardilouze, MD, PhD. Programme de physiologie

Emanuel Escher, PhD. Programme de pharmacologie

Éric Rousseau, PhD. Programme de physiologie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-61424-2
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-61424-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

RÉSUMÉ

Le flot sanguin est un facteur déterminant de l'activité métabolique du tissu adipeux. En effet, tout échange métabolique ou hormonal dépend obligatoirement du produit du flot sanguin et de la différence artérioveineuse du métabolite étudié. Le stockage et la libération énergétique de même que la sécrétion d'hormones et d'adipocytokines nécessitent une régulation précise du flot sanguin dans le tissu adipeux (FSTA).

Ce mémoire comportera essentiellement trois parties.

Dans la première, nous ferons la recension des écrits qui concernent la régulation du FSTA. Nous avons écrit une revue sur le sujet. Nous décrirons le rôle de l'insuline, des hormones gastro-intestinales, du système nerveux sympathique et parasympathique, de l'endothéline et de diverses cytokines. Nous montrerons aussi que l'absence d'élévation du FSTA en condition postprandiale est une caractéristique de l'insulino-résistance et de l'obésité. Cette caractéristique justifie l'exploration de la physiologie vasculaire du tissu adipeux pour une meilleure compréhension des mécanismes patho-physiologiques qui sous-tendent ces deux pathologies.

Dans la deuxième partie, nous discuterons des diverses techniques de mesure du FSTA chez l'humain, la mesure de clairance du ^{133}Xe , la microdialyse ou d'autres méthodes plus dispendieuses ou non validées. Nous décrirons ensuite une nouvelle méthode, la microinfusion, qui permet de mesurer le FSTA avec la technique de clairance du ^{133}Xe et de le faire varier simultanément en infusant dans le site radioactif, de façon continue, des agents vasoactifs. Un détecteur placé au-dessus de la source permet l'enregistrement de la clairance

du ^{133}Xe du tissu adipeux vers la circulation sanguine en relation avec les changements environnementaux induits. Le tissu adipeux sous-cutané abdominal a été choisi comme site anatomique d'investigation. Cette méthode permet la comparaison directe entre des composés vasoactifs, agents pharmacologiques ou hormones, et un contrôle controlatéral situé à la même hauteur sur l'abdomen. La description précise de cette méthode fait l'objet d'un deuxième article. Nous y montrons aussi que la microinfusion améliore la précision et la faisabilité des études physiologiques et pharmacologiques *in vivo* chez l'humain et qu'elle a déjà permis l'évaluation de plusieurs acteurs potentiels impliqués dans la régulation du FSTA chez des sujets sains.

Enfin, dans la troisième partie nous ferons le point de notre expérience de maîtrise, des difficultés et des déboires que nous avons eus dans la mise au point de la technique à Sherbrooke.

Nous concluons en montrant que la microinfusion va permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes sous-jacents au syndrome d'insulino-résistance, au développement du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Son implantation et sa mise au point à Sherbrooke sont donc amplement justifiées.

Nombre de mots : **416**

Mots clés : activité métabolique, flot sanguin, microinfusion, tissu adipeux, traceur radioactif.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS	III
LISTES DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	IV
RÉSUMÉ	VI
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION	1
Anatomie du tissu adipeux	1
Histologie	1
Vascularisation	5
Innervation	6
Implication du système nerveux sympathique	6
Implication du système nerveux parasympathique	8
Le TA comme site de stockage énergétique	9
Source plasmatique de TAG	10
La lipogenèse <i>de novo</i>	12
Le TA comme tissu fournisseur d'énergie	13
Le TA et la stéroïdogénèse	15
Le TA comme organe endocrine	15
Activité métabolique du tissu adipeux: importance du flot sanguin	16
CHAPITRE 2	20
ARTICLES SCIENTIFIQUES INTEGRES	20
Article 1) Update on adipose tissue blood flow regulation	20
Avant-propos de l'article	20
Résumé	20
Article	22
Article 2) A new technique for investigating the metabolism and pharmacology of subcutaneous adipose tissue	68
Avant-propos de l'article	68
Résumé	68
Article	70

	II
CHAPITRE 3	97
ÉNONCE DES OBJECTIFS DU PROJET DE MAITRISE	97
CHAPITRE 4	99
RESULTATS ET DISCUSSION	99
Résultats initiaux	99
Objectif révisé	102
Paramètres du Mediscint System	104
Calibration du Mediscint System	106
Expériences acquises	111
Preuves à l'appui	114
CHAPITRE 5	118
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	118
REMERCIEMENTS	120
LISTE DES RÉFÉRENCES	122
ANNEXE	134

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

CHAPITRE 1

1.1 Tissu adipeux uniloculaire.....	2
1.2 Adipocytes.....	3
1.3 Métabolisme du tissu adipeux.....	13

CHAPITRE 4

4.1 Comparaison des Mediscint System Dr Carey vs Dr Ardilouze. Mesure de variations de pseudo flot par intervalles de 10 min.....	107
4.2 Stimulation du FSTA par microinfusion d'isoprotérénol 1×10^{-4} M chez 6 sujets. Mesures effectuées avec notre Mediscint System.....	109
4.3 Déroulement des tests de validité.....	114
4.4 Mesure du FSTSA – test de validité, sujet 1.....	116
4.5 Mesure du FSTA – test de validité, sujet 2.....	117

LISTES DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ACTH	Hormone corticotrope (Adreno cortico tropic hormone)
AGL	Acide gras libre
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Ang II	Angiotensine II
apoB-48	Apolipoprotéine B-48
apoB-100	Apolipoprotéine B-100
apoC-II	Apolipoprotéine C-II
ASP	Acylation stimulating protein
ATP	Adénosine triphosphate
CsI(Tl)	Césium iodine thallium
CV	Coefficient de variation
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
ET	Endothéline
FIAP	Fasting induced adipose factor
FSTA	Flot sanguine dans le tissu adipeux
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
HSL	Lipase hormono-sensible
IL-6	Interleukine-6
ISO	Isoprotérénol
LPL	Lipoproteine lipase
NO	Oxyde nitrique
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1

PPP	Voie des pentoses phosphate
SNPS	Système nerveux parasympathique
SNS	Système nerveux sympathique
S-RaMS	Spatial Radiation Monitoring System
TA	Tissu adipeux
TABc	Tissu adipeux blanc ou tissu adipeux uniloculaire
TABn	Tissu adipeux brun ou tissu adipeux multiloculaire
TAG	Triacylglycérol
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
TSH	Hormone thyroïdienne (thyroid stimulating hormone)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
^{133}Xe	$^{133}\text{Xénon}$
λ	Coefficient de partition tissu/sang

CHAPITRE 1

Introduction

Anatomie du tissu adipeux

Histologie

Le tissu adipeux (TA) est un tissu conjonctif aréolaire modifié en vue du stockage des nutriments. Les adipocytes, communément appelés cellules adipeuses ou graisseuses, y prédominent. Ils dérivent de précurseurs mésenchymateux, les lipoblastes. Les adipocytes sont soit isolés, soit surtout regroupés en amas dans les tissus de soutien lâches, et constituent le type cellulaire prédominant du TA (Stevens *et al.*, 2006). Deux types de tissu servent au stockage des graisses : les tissus adipeux uniloculaire (TA blanc) et multiloculaire (TA brun).

Le TA uniloculaire se développe à partir du mésenchyme embryonnaire avec la formation de cellules fusiformes (lipoblastes) contenant de petites vacuoles lipidiques. Ces cellules se différencient en adipocytes, source ultérieure d'énergie pour d'autres tissus de l'organisme (Stevens *et al.*, 2006). Les adipocytes composent à 90% le TA blanc (TABc) et sont entassés de manières très serrés entre eux dans le tissu. Ils sont séparés en lobules par de minces feuillets de tissu conjonctif lâche permettant le passage de vaisseaux sanguins et de nerfs jusqu'aux cellules (Fig 1.1). Le tissu conjonctif comprend des fibroblastes, des leucocytes, des macrophages, des pré-adipocytes, des fibres de collagène et des mastocytes (Gurr *et al.*, 1978). On y retrouve également des canaux lymphatiques (Pond *et al.*, 1995). Bien que très peu d'études aient investigué sur l'association entre le TA et les nœuds lymphatiques, il

semble que les cellules adipeuses nourrissent et régulent le métabolisme des cellules lymphatiques (Pond *et al.*, 1995)..

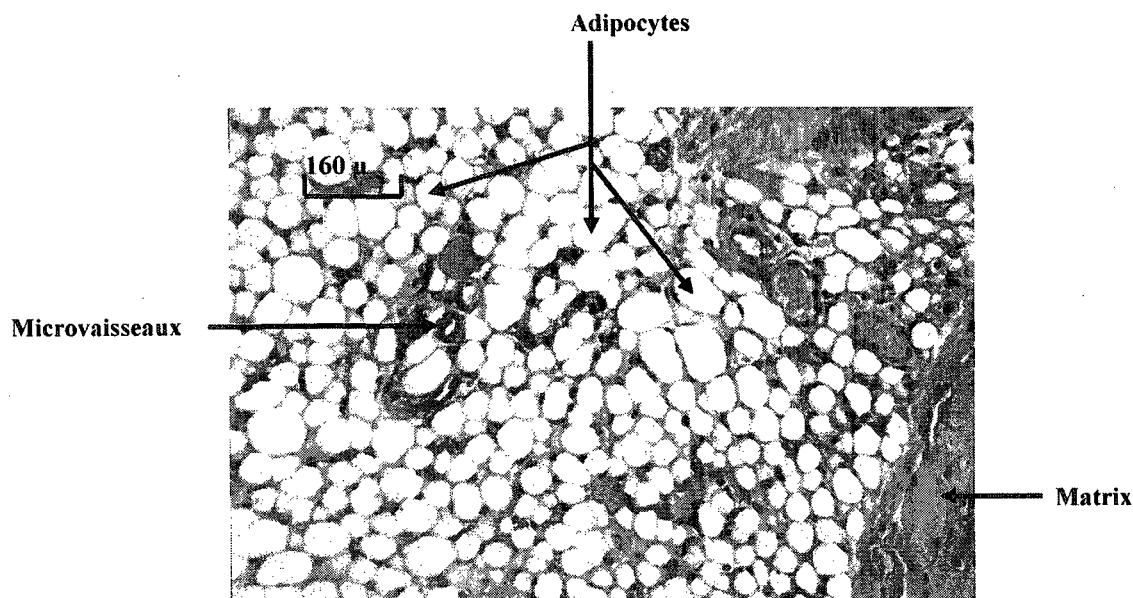


Fig 1.1 – Tissu adipeux uniloculaire.

Ref: www.lumen.luc.edu/lumen/MedEd/Histol

Les adipocytes ont une forme arrondie ou polyédrique due à leur organisation. Ils stockent les triglycérides dans une gouttelette lipidique unique qui occupe la plus grande partie de leur espace cellulaire. Le noyau de l'adipocyte est comprimé par l'inclusion lipidique et repoussé contre la membrane plasmique ce qui donne cette forme d'anneau à la cellule. Le cytoplasme est réduit à une mince couronne périphérique (Fig 1.2). On retrouve les mitochondries dans la partie plus épaisse de la couronne (1-2 microns) près du noyau. Les adipocytes sont parmi les plus grandes cellules du corps, ils peuvent varier de 25 à 200 microns. Ils sont incapables de se diviser. Ils gonflent ou rétrécissent à mesure qu'ils absorbent ou libèrent des graisses.

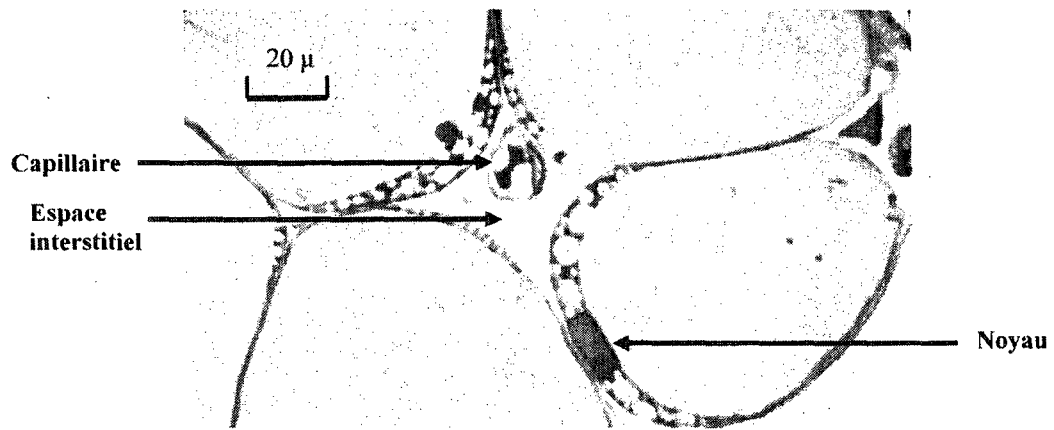


Fig 1.2 – Adipocytes. Le noyau de l'adipocyte est comprimé par l'inclusion lipidique et repoussé contre la membrane plasmatique.

Ref: www.lumen.luc.edu/lumen/MedEd/Histol

Approximativement, 60 à 85% de la masse du TABc est composée de lipides, dont 90 à 99% sont des triglycérides. Des petites quantités d'acides gras libres, de diglycérides, de cholestérol, de phospholipides et de monoglycérides sont également présentes. Les variations dans la diète peuvent faire varier le profil lipidique des acides gras libres dans le tissu (Field *et al.*, 1989; Raclot *et al.*, 1995). Le restant de la masse du TABc provient de sa composition en eau (5-30%) et protéines (2-3%).

Le TABc est la forme principale de stockage des graisses chez l'adulte. Il sert également de tissu de soutien.

Le TA multiloculaire, ou TA brun (TABn) a comme différence visuelle majeure avec le TABc sa couleur, résultant des nombreuses mitochondries présentes dans le cytoplasme et des multiples gouttelettes permettant le stockage des lipides (Gesta *et al.*, 2007). Les cellules du TABn possèdent une capacité d'oxydation beaucoup plus élevée que les adipocytes du TABc. Les nombreuses mitochondries permettent le découplage de l'oxydation et de la déphosphorylation. Au lieu de produire de l'ATP, les cellules du TABn dégagent de la chaleur (Gartner *et al.*, 2004). Cet effet thermogénique est dû à la présence de la protéine

découplante 1 (UCP1) et possiblement de ces homologues, UCP2 et UCP3 (Boss *et al.*, 1998) dans les mitochondries. On retrouve dans le TABn un très grand nombre de capillaires sanguins. L'élévation du flot sanguin dans ces capillaires permet le transport de la chaleur produite par le métabolisme des graisses vers le reste de l'organisme. Le TABn est présent chez le mammifère hibernant, le fœtus et le nouveau-né. Chez l'adulte, on n'en retrouve que de petites quantités, mais il est de plus en plus évident qu'il pourrait jouer un rôle, au moins chez certains individus, dans l'accroissement de la dépense énergétique, prévenant ainsi l'obésité (Wheater *et al.*, 2001). Nous ne décrivons pas plus ce tissu : ce mémoire porte sur le TABc.

Sans les réserves de graisses accumulées dans le TA nous ne pourrions survivre à plus de quelques semaines de jeûne. Le TA est certes abondant : il constitue de 10 à 30% de la masse d'un individu moyen (20% chez l'homme et 30% chez la femme). La proportion de la masse représentée par la graisse peut même atteindre 3-5% chez l'athlète et les personnes très minces et aller jusqu'à 70% et plus chez les personnes obèses (Jensen, 2002).

Le TA peut apparaître dans presque toutes les régions où le tissu conjonctif aréolaire est abondant, mais il s'accumule généralement dans le tissu sous-cutané, où il joue aussi le rôle d'amortisseur et d'isolant. Puisque le TABc conduit mal la chaleur, elle contribue à prévenir la perte de chaleur corporelle. le TABc s'accumule en outre dans la moelle osseuse jaune, autour des reins, derrière les bulbes de l'œil ainsi qu'à des endroits génétiquement déterminés, comme l'abdomen et les hanches. Nous n'irons pas plus loin dans la description du TA intra-abdominal, malgré son importance aujourd'hui, puisque le TABc viscéral compte pour beaucoup au chapitre de la résistance à l'insuline et du syndrome métabolique : ce mémoire porte sur le TABc.

Vascularisation

Le TA est un tissu richement vascularisé, signe de sa grande activité métabolique. Le nombre de capillaires par unité de volume cytoplasmique est supérieur au niveau du TA que dans le muscle squelettique (Gersh *et al.*, 1945). Même au stade préliminaire du développement de l'organisme, une relation spatiale très serrée est observée entre les vaisseaux sanguins et les adipocytes (Crandall *et al.*, 1997).

Les capillaires composant le système de vascularisation sont très minces. Ils sont supportés par une fine couche de tissu conjonctif. On retrouve fréquemment des capillaires ayant des diamètres inférieurs à 4-5 micromètres. En ligne droite, ou en traçant des courbes, ils se fraient un chemin au travers des adipocytes (Ryan *et al.*, 1989).

L'importance de l'espace interstitiel du TA, chez les personnes de poids normal, est inférieure à plusieurs autres tissus : elle représente environ 10% du poids du tissu, comparé à plus de 20% dans les autres tissus (Bjorntorp *et al.*, 1966). Le coefficient de filtration capillaire, ou la capacité de filtration par le système vasculaire, est 2-3 fois supérieur dans le TA que dans le muscle squelettique au repos (Fredholm *et al.*, 1969). Le TA pouvant composer jusqu'à plus de 50% du poids corporel total, le volume de fluide compris dans le TA peut donc devenir très important (Waki *et al.*, 1991).

Il existe une relation inverse entre la grosseur de l'adipocyte et l'apport sanguin. Il a été observé chez le chien que le flot sanguin est inversement proportionnel à la grosseur des adipocytes, soit un flot sanguin plus lent en présence de larges cellules grasses et *vice versa* (Di Girolamo *et al.*, 1971).

La circulation sanguine dans le TA fournit un apport suffisant à l'activité métabolique du tissu qui se produit dans la partie du cytoplasme entourant la gouttelette lipidique. Comme pour le muscle squelettique, il est assumé que le contrôle de la perfusion capillaire est effectué dans les segments proximal et terminal des artérioles (Lindbom, 1983).

Innervation

Très peu d'études histologiques ont été effectuées sur l'innervation du TA humain.

Implication du système nerveux sympathique

Il est connu depuis plusieurs années que le système nerveux sympathique (SNS) est un régulateur direct des nombreuses fonctions du TA, de la perméabilité capillaire et de la régulation du flot sanguin (Rosell *et al.*, 1979). Par contre, certaines études ont démontré que le SNS innervait seulement les vaisseaux sanguins dans le TA, et concluaient que l'innervation avait pour unique but le contrôle le flot sanguin (Bartness *et al.*, 2007). Ces conclusions sont basées sur l'incapacité de détecter des fibres neuronales, incapacité qui est probablement liée à l'entassement très serré des adipocytes entre eux. Par l'augmentation de la lipolyse, en période de jeûne, la diminution volumique des adipocytes a permis de révéler l'innervation afférente directe, par la mise en évidence de libération de catécholamines, des cellules adipeuses et des vaisseaux sanguins (Burgoyne *et al.*, 2003; Raclot *et al.*, 1995; Yki-Jarvinen *et al.*, 1998). De plus, la présence de récepteurs adrénergiques par le TA humain a été bien démontrée (Jaworski *et al.*, 2007). On retrouve 3 sous-types de récepteurs β -adrénergiques; β_1 , β_2 et β_3 , ainsi que le récepteur adrénergique α_2 . Il a été observé chez le rat que les plus hauts niveaux d'innervation se retrouvent dans le dépôt mésentérique et que les plus faibles sont dans la région inguinale (Rebuffe-Scrive,

1991). Une autre évidence de l'innervation afférente directe des adipocytes par les neurones post-ganglionnaires du SNS a été fournie par l'injection de traceurs fluorescent antérograde, 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI) et fluorescent rétrograde, FluoroGold, chez des hamsters Sibérien avec l'observation d'anneaux fluorescents entourant les cellules adipeuses des régions sous-cutanée et inguinale (Bartness *et al.*, 2007; Youngstrom *et al.*, 1995). Il a été démontré que certaines des innervations de ces deux régions ne provenaient pas des mêmes parties du SNS, soit une innervation *via* les ganglions T₁₃, L₁-L₂ pour la région sous-cutané, soit une innervation *via* seulement le ganglion T₁₃, pour la région inguinale (Youngstrom *et al.*, 1995), révélant une structure d'activation sélective du TA.

Comme l'innervation du TA peut avoir différents effets sur ses fonctions, elle semble également avoir différents effets sur les actions efférentes du tissu en envoyant des signaux tant à la moelle épinière qu'au cerveau. L'injection de petites quantités de leptine dans le TA péri-rénal chez le rat a été associée avec l'augmentation de l'activité sympathique rénale efférente sans altérer les concentrations de leptine plasmatique (Tanida *et al.*, 2000). Des études chez les hamsters et les rats ont démontré une connexion neuronale directe entre le TA et différentes régions du cerveau impliquées, via le SNS, dans la régulation de plusieurs systèmes tel que le système cardiovasculaire (Bamshad *et al.*, 1998).

Les effets similaires induits par les catécholamines et les agonistes et les effets opposés obtenus avec les antagonistes des récepteurs adrénergiques sur le TA humain et animal, tant au niveau *in vitro* que *in vivo*, indiquent que le mode d'innervation observé dans les conditions expérimentales animales se retrouve également chez l'humain.

S'il a été démontré que le TA humain est innervé, il reste à déterminer si cette activité neuronale peut avoir un effet sur la régulation métabolique du tissu. Des études ont tenté de déterminer le rôle du SNS sur la lipolyse, par l'interruption des signaux sympathiques descendant résultant d'une lésion à la moelle épinière ou des ganglions sympathiques. Ces études ont démontré que l'innervation sympathique n'avait pas d'effets clairs sur les niveaux basaux de lipolyse du TA (Karlsson *et al.*, 1995), mais que l'innervation sympathique en condition d'excitation sympathique induisait la lipolyse (Karlsson *et al.*, 1997). Des études chez des sujets sains ont également démontré, par une stimulation *in situ* d'un nerf cutané et de la mesure de la libération de glycérol dans la zone innervée, que la stimulation neuronale induisait la lipolyse (Dodt *et al.*, 2003). Même si de nombreuses études établissent que l'innervation du TA par le SNS est le principal régulateur de la lipolyse sous-cutanée, la neuroanatomie du SNS dans le TA reste à être décrite en détails chez l'humain.

Implication du système nerveux parasympathique

La plupart des tissus sont doublement innervés par les deux composantes du système nerveux autonomes, soit le SNS et le système nerveux parasympathique (SNPS), deux systèmes dont les actions sont généralement opposées. Bien que plusieurs études suggèrent la présence d'une innervation du SNPS dans le TA en plus de l'innervation SNS, le sujet reste encore chaudement débattu. Une étude utilisant la microdialyse a démontré qu'une stimulation des récepteurs nicotiniques augmentait la lipolyse, alors qu'une stimulation des récepteurs muscariniques diminuait l'activité de lipolyse du TA *in vivo* chez l'humain (Andersson *et al.*, 1995). À l'inverse, certaines études vont contre une composante SNPS dans le TA (Kreier *et al.*, 2002). Par exemple, il n'y a pas a) d'identification de marqueurs du SNPS au niveau du TA et b) d'identification de ganglions du SNPS à l'intérieur ou environnant le TA

(Youngstrom *et al.*, 1995). Une autre étude a également examiné trois marqueurs du SNPS, dans trois modèles animaux et dans trois tissus adipeux différents. Leurs résultats amènent à conclure à l'absence neuroanatomique de l'innervation du SNPS au niveau du TA (Bartness *et al.*, 2007). Mais ces résultats, parfois anciens, sont combattus par des travaux récents : l'innervation parasympathique du TA a été démontrée par l'utilisation d'un « retrograde transneuronal tracer pseudo-rabies virus » (Kreier *et al.*, 2002) sur du TA chirurgicalement dénervé de fibres sympathiques. De plus, suite à une vagotomie, la captation des acides gras libres (AGL) et du glucose médiée par l'action de l'insuline fut diminuée, et l'activité de la lipase hormono-sensible (HSL) augmentée. Ces données indiquent un rôle potentiel anabolique du nerf vague sur le TA. Les masses graisseuses sous-cutanée et intra-abdominale semblent également être innervés par des neurones parasympathiques et sympathiques (Kreier *et al.*, 2002).

Devant ces résultats opposés, l'implication du SNPS dans l'activité du TA doit être investiguée. Une implication hypothétique des rôles opposés du SNS et SNPS suggérerait un certain contrôle neuronal dans les processus catabolique et anabolique du TA. Malgré des opinions dichotomiques sur l'implication du SNPS, il est clair que l'innervation du système nerveux autonome dans le TA est un facteur d'importance majeur dans la régulation de l'activité du tissu.

Le TA comme site de stockage énergétique

Longtemps, le TA fut considéré comme un lieu de stockage inerte. L'intérêt pour ce tissu c'est accentué lors de la découverte de son rôle dans la transformation des hormones stéroïdiennes et quand le lien entre obésité, diabète et maladies cardiovasculaires a été fait.

La recherche sur le TA peut être divisée en trois périodes. La première où, les deux aspects métaboliques distincts du TA ont été considérés : le stockage des triglycérides (TAG) après les repas et la libération des AGL dans l'organisme lorsque requis (période d'exercice et jeûne). La deuxième où le TA a été compris comme un lieu d'interconversion pour les hormones stéroïdiennes (Siiteri, 1987) et, plus récemment, la troisième qui considère le TA comme un organe endocrine multifonctionnel produisant et sécrétant une variété de facteurs, hormones, cytokines et autres, ayant des effets locaux et systémiques (Hauner *et al.*, 2002).

Les TAG contenus dans les adipocytes constituent une source d'énergie importante de notre organisme. L'importance du dépôt et de l'utilisation des graisses dans le TA est en grande partie déterminée par l'apport alimentaire et la dépense énergétique. Deux routes majeures permettent l'apport des TAG au TA.

Source plasmatique de TAG

Dans le plasma, les TAG sont présents sous la forme de particules de lipoprotéines, de chylomicrons et de VLDL (lipoprotéines de très basse densité). Les chylomicrons transportent les lipides absorbés provenant du tube digestif. Ils ont la densité la plus faible de toutes les lipoprotéines, ce sont des gouttelettes hydrosolubles de lipoprotéines. Ils contiennent en leur centre des TAG et du cholestérol entourés de phospholipides et d'une « pellicule » de protéines (protéines de structure, apoB-48). Le foie est la principale source de VLDL. Les VLDL contiennent des apolipoprotéines (apo) B-100 et sont très riches en TAG. Les VLDL transportent les TAG, qui ont été fabriqués ou transformés dans le foie, de la circulation sanguine vers les tissus périphériques avec une préférence pour le TA. Lorsque

tous ces TAG ont été conduits à leur point de destination, les résidus des VLDL sont convertis en LDL (lipoprotéines de basse densité), riches en cholestérol (Karpe *et al.*, 1993).

Ces larges particules contenant les TAG sont trop grosses pour pouvoir traverser les membranes des capillaires vers les fluides interstitielles. Les chylomicrons adhèrent à des sites de liaison sur la surface interne, l'endothélium, des capillaires du TA ou des muscles squelettiques. Les TAG des chylomicrons sont ensuite hydrolysés en AGL et en glycérol grâce à une lipoprotéine lipase (LPL) (Fielding *et al.*, 1998; Olivecrona *et al.*, 1995), une enzyme extracellulaire, associée à l'endothélium capillaire, produite par les adipocytes et activée par l'apolipoprotéine C-II (apoC-II). Les AGL et le glycérol libérés peuvent alors traverser les parois des capillaires et servir de source d'énergie cellulaire, ou être emmagasiné sous forme de lipides dans le TA (Fig 1.3). Une fois à l'intérieur de l'adipocyte, les AGL sont estérifiés à l'aide du glycérol-3-phosphate pour reformer un TAG. Ainsi ils peuvent rejoindre la gouttelette lipidique de la cellule pour entreposage. L'activité de la LPL, l'estérification et la production de glycérol-3-phosphate via la glycolyse sont stimulés par l'insuline (Frayn *et al.*, 1994). Cette influence de l'insuline indique qu'après un repas typique, avec teneur en lipides et en glucose, le captage et l'entreposage des graisses dans le TA sont efficacement stimulés. Une autre protéine, « Acylation stimulating protein » (ASP) entre également dans la régulation de la lipogénèse (Baldo *et al.*, 1993). ASP est produite dans les adipocytes. La production d'ASP *in vivo* est augmentée en période post-prandiale (Saleh *et al.*, 1998), donnant à l'ASP un rôle potentiel dans la coordination de l'entreposage des graisses après l'ingestion d'un repas.

La voie de la LPL est une voie importante pour le stockage des graisses dans les adipocytes. Cependant, il est connu que les personnes déficientes en LPL ont des adipocytes relativement

normaux (Peeva *et al.*, 1992). Chez des souris dont la LPL est absente, on retrouve une masse de TA normale. D'autres voies pour le stockage des graisses doivent donc exister. Il est argumenté que la synthèse de TA en cas d'absence de la LPL est effectuée via la lipogenèse *de novo* (Weinstock *et al.*, 1997).

La lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* est une autre voie de la synthèse du TA. Cette voie est également stimulée à de multiples points par l'insuline. La synthèse des TAG se produit lorsque les concentrations d'ATP dans les cellules et de glucose dans le sang sont élevées. L'excès d'ATP entraîne une accumulation des intermédiaires du métabolisme du glucose, dont l'acétyl CoA qui en cas d'excès est acheminé vers les voies de synthèses des TAG (Fig 1.3). La première étape, régulée par l'insuline, est la transformation par l'acétyl CoA carboxylase de l'acétyl CoA en malonyl CoA. Par la suite, la chaîne d'acides gras s'allonge de deux atomes de carbones à la fois. Comme l'acétyl CoA, un intermédiaire du catabolisme du glucose, est également un point de départ pour la synthèse des acides gras, le glucose peut facilement être converti en lipides. Même avec un régime pauvre en lipides, un apport excessif de glucides fournit toutes les matières premières nécessaires à la formation des TAG. Lorsque la glycémie est élevée, la lipogenèse devient l'activité principale du TA.

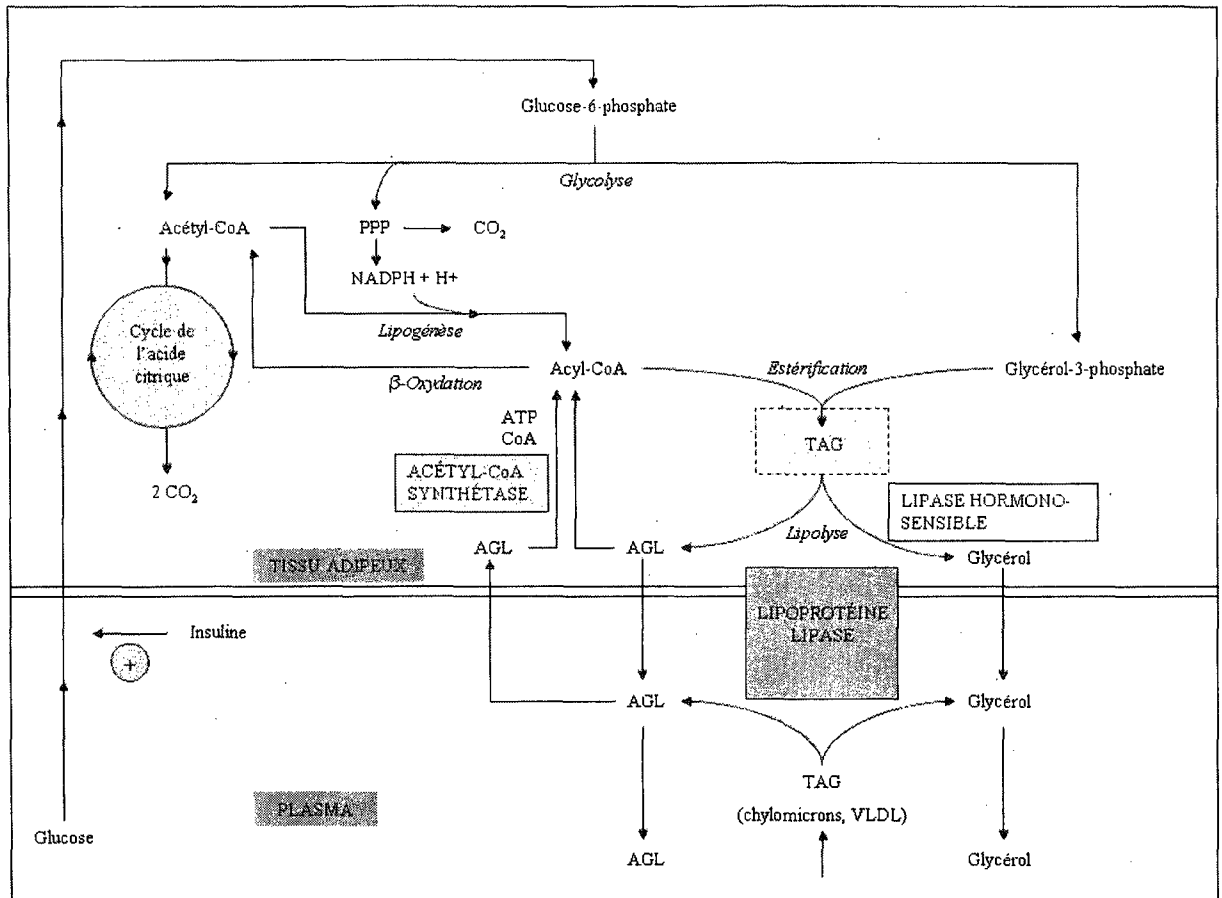


Fig 1.3 – Métabolisme des acides gras dans le tissu adipeux.

Le TA comme tissu fournisseur d'énergie

La dégradation des réserves lipidiques comme source énergétique est la lipolyse. Elle résulte de la libération des acides gras et du glycérol du pool de TAG contenu dans les adipocytes vers la circulation sanguine. Les acides gras sont libérés dans la circulation plasmatique sous la forme d'acides gras libres liés à l'albumine. La lipolyse est activée par la HSL (Langin *et al.*, 1996). La HSL agit à la surface de la gouttelette lipidique et clive le lien ester entre deux acides gras et le glycérol (Fig 1.3). Une enzyme, la monoacylglycérol lipase, libère un troisième acide gras (du glycérol). Trois acides gras et une molécule de glycérol sont produits avec chaque molécule de TAG emmagasiné dans le TA.

La régulation de HSL est très précise. La HSL est inactive lorsque les niveaux d'insuline sont élevés (Coppack *et al.*, 1989). La HSL est activée par phosphorylation via une protéine kinase A, elle-même activée par l'élévation cellulaire des niveaux d'AMPc. La phosphorylation de HSL est parallèlement accompagnée de sa translocation du cytosol vers la surface de la gouttelette lipidique de l'adipocyte et de la phosphorylation de la perilipine, une protéine masquant le dépôt lipidique qui, après stimulation, permet l'accès à la HSL (Clifford *et al.*, 2000). Une augmentation de la lipolyse, par la phosphorylation de la perilipine et de la HSL, est stimulée par l'action des catécholamines sur les récepteurs β -adrénergiques. En condition de jeûne prolongé, une stimulation *via* les récepteurs β -adrénergiques et la désinhibition progressive de l'insuline, agissant comme co-régulateur sur la lipolyse, entraînent une augmentation régulière de l'activité lipolytique (Arner *et al.*, 1990). Dans ces conditions de jeûne, une sécrétion d'hormones de croissance (Samra *et al.*, 1999) et une élévation matinale du cortisol (Samra *et al.*, 1996a) semblent également jouer des rôles modulateurs.

La déphosphorylation de HSL, médiée par l'insuline, la rend inactive. Cette action de l'insuline implique une dégradation des niveaux d'AMPc en 5'-AMP par la 3'5' nucléotide phosphodiesterase cyclique. L'insuline stimule également la phosphodiesterase et la lipase phosphatase qui inactive la HSL. Cette inhibition a un effet puissant et rapide, elle a lieu à des bas niveaux de concentrations d'insuline et dès le début de leur élévation. La concentration maximale d'insuline nécessaire pour la suppression de la libération des graisses dans la circulation plasmatique chez l'humain à jeun est d'environ 90 pmol/L alors qu'elle est de 200 pmol/L pour la stimulation de la lipogenèse en condition post-prandiale (Campbell *et al.*, 1992). L'insuline inhibe la libération des AGL du TA, entraînant une chute

de la quantité des AGL plasmatiques circulant. Elle stimule la lipogenèse et la synthèse des acylglycérols et augmente l'oxydation du glucose en CO_2 par la voie des pentoses phosphates (PPP). L'insuline favorise la lipogenèse et restreint la lipolyse. La HSL est également activée par l'hormone corticotrope (ACTH), l'hormone thyroïdienne (TSH), le glucagon, l'adrénaline, la noradrénaline et la vasopressine. En plus de l'insuline, elle est inhibée par la prostaglandine E et l'acide nicotinique (Watt *et al.*, 2008).

Le TA et la stéroïdogénèse

Le TA est également un site d'inter-conversion des hormones stéroïdiennes. Il produit des stéroïdes sexuels et des glucocorticoïdes, tels que la production d'œstrogènes via les androgènes et du cortisol à partir de la cortisone (Boulton *et al.*, 1992; Katz *et al.*, 1999). La participation du TA pour la conversion des stéroïdes sexuels est quantitativement importante, elle représente de 10-20% de la production totale de l'organisme (Katz *et al.*, 1999). Cette conversion est finement régulée par l'insuline et augmente dans les cas d'obésité (Bjorntorp, 1996; Frayn *et al.*, 2003).

Le TA comme organe endocrine

Comme mentionné précédemment, le TA a été longtemps considéré comme un organe passif servant uniquement au stockage énergétique, puis un site d'inter-conversion. Ces dix dernières années, la recherche a démontré la nature complexe de ce tissu et renversé ce point de vue traditionnel. Les adipocytes sont maintenant reconnus pour sécréter une grande variété d'hormones et de facteurs, appelés adipokines. Elles peuvent jouer un rôle tant au niveau local (autocrine, paracrine), qu'au niveau systémique (endocrine) (Goossens, 2008).

Cytokines, facteurs de croissance, adiponectine, résistine, adiposine, leptine, « acylation stimulating protein » (ASP), « plasminogen activator inhibitor-1 » (PAI-1), lipoprotéine lipase (LPL), « tumor necrosis factor- α » (TNF- α), interleukine-6 (IL-6), « fasting induced adipose factor » (FIAP), « vascular cell adhesion molecule-1 » (VCAM-1), composantes du système rénine-angiotensine font entre autres partie des adipokines sécrétées par le TA (Frayn *et al.*, 2003; Fruhbeck *et al.*, 2001; Kershaw *et al.*, 2004). Le TA envoie et reçoit de nombreux signaux endocrines, métaboliques et inflammatoires. Il semble moduler en partie l'homéostasie de l'organisme par de multiples systèmes incluant, les réponses immunitaires et inflammatoires, la coagulation sanguine, la reproduction, les fonctions endothéliales et la différenciation des adipocytes. Il est de plus en plus évident qu'il existe une interaction croisée entre les cellules adipeuses et plusieurs autres tissus comme l'endothélium, les muscles, le foie, le pancréas, les glandes surrénales et les structures du système nerveux centrale. Ainsi, en plus de pouvoir moduler ses propres activités métaboliques, le TA peut transmettre des signaux vers d'autres tissus et moduler leur métabolisme (Goossens, 2008). Les adipocytes expriment également de nombreux récepteurs qui permettent la réponse à des signaux afférents, tels que des hormones et des signaux émis par le système nerveux central (Goossens, 2008). Plusieurs facteurs dérivés des adipocytes (surtout la cytokine TNF α) ont été identifiés pour avoir des effets sur la transduction du signal de l'insuline et ainsi contribuer au développement de l'insulino-résistance et de l'athérosclérose chez les patients obèses avec ou sans diabète de type 2 (Frayn *et al.*, 2003; Yudkin, 2007).

Activité métabolique du tissu adipeux: importance du flot sanguin

Le stockage et la libération d'énergie, la sécrétion d'adipokines demandent une régulation précise du flot sanguin dans le tissu adipeux (FSTA), c'est un processus hautement

coordonné avec un contrôle constant et changement rapide selon les besoins métaboliques. Quatre points soulignent l'importance d'un FSTA coordonné et régulé.

Premièrement, les échanges hormonaux et métaboliques (Ex) dans un tissu dépendent du produit du flot sanguin et de la différence de concentration artério-veineuse du métabolite ou de l'hormone (A-V) :

$$Ex = BF \times (A-V)$$

Deuxièmement, le FSTA semble augmenter pendant la mobilisation d'énergie du TA par l'organisme ou vice versa : la libération d'AGL (période de jeûne, exercice prolongé), la clairance des TAG de la circulation sanguine vers le TA (période postprandiale). Les variations de FSTA semblent être reliées à l'activité métabolique du tissu. La clairance des TAG du sang, reflétant à un premier niveau l'activité des lipoprotéines lipases, augmente en parallèle avec l'augmentation du flot sanguin lorsque ce dernier est stimulé par une infusion d'épinéphrine (Samra *et al.*, 1996b). Cependant, lorsque stimulé par un repas, le flot sanguin augmente rapidement et n'est pas synchronisé avec l'augmentation de la concentration plasmatique de TAG, l'action des LPL ou le dépôt de graisse dans le TA qui surviennent plus tardivement. L'élévation du flot sanguin après l'ingestion d'un repas semble davantage liée avec l'augmentation de la concentration plasmatique d'insuline et la suppression de la libération des AGL par le TA (Coppack *et al.*, 1992). L'augmentation du FSTA en période postprandiale pourrait servir à la livraison d'un signal, l'insuline par exemple, pour initier l'augmentation postprandiale de l'activité des LPL. L'insuline a également comme action de supprimer la libération des AGL, ce qui altère les réponses vasodilatatrices (Steinberg *et al.*, 1997). Les AGL contenus dans le TA sont sujets à de plus grandes variations que celles que l'on peut trouver dans le muscle squelettique. S'il existe une relation physiologique entre les

variations de concentrations d'AGL et le flot sanguin, le TA est l'organe primaire pour la régulation de ces variations. Peut-être le lien physiologique de la régulation du FSTA, il est régulé selon l'apport nutritionnel à l'organisme.

Troisièmement, une altération dans la régulation du FSTA est reliée à l'obésité et à l'insulino-résistance (Jansson *et al.*, 1998; Karpe *et al.*, 2002b; Summers *et al.*, 1999). Chez les personnes obèses et/ou souffrant d'une résistance à l'insuline, le FSTA à jeun est inférieur que chez les personnes en santé de poids normal, tandis que l'augmentation postprandiale du FSTA est abolie (Blaak *et al.*, 1995; Coppack *et al.*, 1992; Jansson *et al.*, 1998; Karpe *et al.*, 2002b; Summers *et al.*, 1996; Virtanen *et al.*, 2001). Il a également été démontré que l'élévation de FSTA postprandiale est également abolie chez tous les stades de diabète de type 2 : parents reliés au premier degré avec des sujets diabétiques de type 2, sujets avec une intolérance au glucose, sujets diabétiques de type 2 avec hyperglycémie postprandiale et glycémie normale à jeun, et sujets diabétiques de type 2 avec hyperglycémie postprandiale et en période de jeûne (Dimitriadis *et al.*, 2007). Il peut être spéculé qu'une mauvaise réponse du FSTA après un repas diminue la clairance, par le TA, des lipides provenant des lipoprotéines. Les lipides sont alors redirigés vers d'autres organes moins bien adaptés pour leur stockage (foie, muscles squelettiques). Il pourrait en résulter une augmentation de la production de VLDL par le foie et une hypertriglycéridémie, conditions qui augmentent le risque de développement des maladies cardiovasculaires.

Quatrièmement, l'importante fonction endocrine du TA pourrait être facilitée par les variations de FSTA, régulant ainsi les entrées et sorties des hormones. Un dysfonctionnement dans la régulation du FSTA pourrait avoir pour conséquence d'atténuer les fonctions endocrines du tissu.

En résumé, une diminution du FSTA peut avoir un effet négatif sur le métabolisme en entraînant une diminution du captage par le TA des acides gras, du glucose et d'hormones, une altération dans la libération de produits de la lipolyse et de peptides du TA vers la circulation (Samra *et al.*, 1996b) et en diminuant la qualité de la signalisation entre le TA et les autres tissus métaboliquement actifs. Une meilleure compréhension des bases physiologiques de la régulation du FSTA pourrait permettre une meilleure compréhension du lien entre un dysfonctionnement du FSTA et les problèmes métaboliques observés en condition d'insulino-résistance.

CHAPITRE 2

Articles scientifiques intégrés

Article 1) Update on adipose tissue blood flow regulation

Avant-propos de l'article

L'article intitulé «Update on adipose tissue blood flow regulation» est une continuité de l'introduction de ce mémoire. Il résume la régulation physiologique connue du FSTA et amène également de nouvelles hypothèses. Les auteurs de cet article sont Pascal Brassard, Elizabeth Martin, Philippe Yale, André C. Carpentier et Jean-Luc Ardilouze. Cet article est une recension des écrits concernant la régulation du FSTA. Ce manuscrit était d'abord destiné à une publication dans le journal *Circulation* qui voulait inclure un article de ce type dans un numéro spécial. L'échéance étant dépassée, l'article a été mis à jour depuis. Il est dans l'attente d'une lecture des co-auteurs afin de pouvoir apporter les corrections nécessaires, puis déterminer dans quel journal ce travail est susceptible d'être publié. Les modifications mineures quant au format seront alors effectuées.

Résumé

Le TA est maintenant reconnu comme un organe métaboliquement très actif et endocrine, délivrant un mélange complexe de substrats et d'hormones exerçant de multiples effets pléiotropes. Le débit du flot sanguin est un régulateur important des fonctions du TA. Les fonctions du TA ayant un impact important sur l'organisme, la régulation de ses fonctions nécessite une extrême précision. Le FSTA varie selon différentes conditions physiologiques

de l'organisme et sa régulation se trouve modifiée dans les cas d'obésité et d'insulino-résistance.

Dans cette article, nous décrirons la physiologie du FSTA en conditions pré et postprandiales, en situation d'exercice physique et selon le poids des individus. De plus, le rôle du SNS, du SNPS, de l'insuline, de l'oxyde nitrique et du système rénine angiotensine dans la régulation du FSTA seront décrits. Il sera également discuté de l'effet des diverses adipocytokines et facteurs inflammatoires libérés par les adipocytes sur le FSTA, le TA et l'organisme. Certains facteurs physiologiques du FSTA jouent un rôle dans la résistance à l'insuline, suggérant qu'une dérégulation du FSTA pourrait être une composante du syndrome d'insulino-résistance. Une meilleure compréhension de la régulation du FSTA conduira à de nouvelles hypothèses physio-pathologiques et perspectives thérapeutiques.

Contribution personnelle à cet article :

- Rescension des écrits de la littérature.
- Rédaction de l'article en collaboration avec Pascal Brassard, PhD.

Article

UPDATE ON ADIPOSE TISSUE BLOOD FLOW REGULATION

Authors:

Pascal Brassard^{1,2}, Elizabeth Martin^{1,2}, Philippe Yale², André C. Carpentier² and Jean-Luc Ardilouze^{2*}.

¹Both authors contributed equally to this work.

Institutions:

²Diabetes and metabolism research group, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

*Corresponding author:

Jean-Luc Ardilouze, MD, PhD

Endocrine Division

Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke

3001 12th Ave N., Sherbrooke, Qc, J1H 5N4

Tel: 819-564-5241

Sources of support:

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), and Diabète Québec.

Jean-Luc Ardilouze is a CIHR scholar (2006 CIHR New Investigator Award) and is member of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-LeBel.

Number of words: 6536

Abbreviations: ATBF, adipose tissue blood flow; CVD, cardiovascular diseases; GLP-1, glucagon-like-peptide-1; HSL, hormone-sensitive lipase; LPL, lipoprotein lipase, NEFA, non-esterified fatty acids; NO, Nitric Oxide; TG, Triglycerides; VO₂max, maximal oxygen volume uptake.

ABSTRACT

Any metabolic or hormonal exchange through a tissue depends on the product of the blood flow and the arteriovenous difference. Therefore, given the storage and endocrine roles of adipose tissue, the regulation of adipose tissue blood flow (ATBF) is of pivotal importance. This paper is an update of the literature, presenting our knowledge and hypothesis on ATBF regulation. It was shown that insulin *per se* has no vasodilatory effect, in the resting state as well as during the postprandial period. Consequently, it has been hypothesised that insulin may act indirectly on ATBF *via* sympathetic activation, and that nitric oxide (NO) may be an overall major regulator of ATBF. Indeed, fasting ATBF is primarily controlled by NO, circulating angiotensine II and to some extent under α -adrenergic. Although the postprandial enhancement of ATBF is independent of NO and is controlled principally, for 60%, by the β -adrenergic system. This suggests that the postprandial regulation of ATBF is complex and may involve other regulatory factors. It is also well known that dependently of the physiological condition of the organism, ATBF varies. *In vivo* studies have shown that adipose tissue is an efficient buffer against the postprandial flux of non-esterified fatty acids in the circulation, protecting other tissues. In excess of fat tissue, this buffering effect may be impaired. This condition includes also a reduced postprandial ATBF response, potentially causing metabolic alterations. Consequently, an alteration in the regulation of ATBF seems to play a role in the development of insulin resistance syndrome. For the future, a better understanding of ATBF regulation could lead to new pathophysiological hypothesis and therapeutic perspectives for obesity, diabetes and cardiometabolic diseases.

Words: 266

Key words: adipose tissue, blood flow.

INTRODUCTION: ADIPOSE TISSUE

Despite its functional importance, for a long time, adipose tissue was considered as an inactive energy store, its sole purpose being the storage of fat for insulation purposes and provision of a protective cushion. Its low rate of oxygen consumption (Frayn, Humphreys, S. M., and Coppack, S. W. 1995; Coppack *et al.* 1990b) would confirm this thought. Scientists were not interested in adipose tissue until it became clear that obesity was related to cardiovascular diseases (CVD) and diabetes. Then, two distinct aspects of the metabolism of adipose tissue have been considered: TG storage after a meal, and liberation of fatty acids when other tissues in the body require it, i.e. during exercise and overnight fasting. Over the last two decades it has become clear that adipose tissue is not only involved in metabolism but that it plays an extremely important role as a regulator of the flow of energy-providing substances. Thereafter, the interconversion of steroid hormones was discovered. (Siiteri 1987) More lately, it has been recognised that adipose tissue is also a multifunctional organ that produces a variety of secretory factors that act either at the local level (autocrine / paracrine / intracrine) or at the systemic level (endocrine). (Hauner and Hochberg, Z. 2002)

Moreover, adipose tissue makes up 10-30% of body weight in normal weight individuals, normally up to 20% in male and up to 30% in female, but its mass can vary from as little as 3-5% of body weight in lean, athletic subjects to 70% in very obese subjects. (Jensen 2002) The adipose tissue is the major energy storage organ of the body. It does indeed store triglyceride (TG). In fact, approximately 80% of adipose tissue weight is lipid, and over 90% of lipids are stored TG. (Shen *et al.* 2003) In healthy individual, it is an efficient manager of non-esterified fatty acids (NEFA), the major secretory product from adipose tissue. NEFA are derived from the lipolysis of stored triglycerides, and regulated by adipocyte and

nonadipocyte factors. If intracellular adipocyte hydrolysis of triglycerides (lipolysis) exceeds intracellular adipocyte esterification of NEFA (lipogenesis), then NEFA undergo a net release into the circulation as an energy supply for other tissues, such as heart and skeletal muscle. A sustained, excessive net increase in circulating NEFA contributes to metabolic disease. Chronic increases in circulating NEFA worsen glucose metabolism due to lipotoxic effects upon muscle and liver, which contribute to insulin resistance,(Carpentier 2008) as well as lipotoxic effects on pancreas, which contribute to insulinopenia.(DeFronzo 2004; Lewis *et al.* 2002) These new findings explain why the hypothesis recently shift from an exclusive glucocentric point of view to a lipocentric viewpoint.(Savage, Petersen, K. F., and Shulman, G. I. 2005)

ADIPOSE TISSUE BLOOD FLOW IN RELATION TO THE MAIN FUNCTIONS OF THE TISSUE

Given the important metabolic and endocrine roles of fat tissue, an adequate perfusion is required. Three points underline the importance of a co-ordinated blood flow in adipose tissue and justify more research about it.

Firstly, in healthy people, during fasting or during exercise, adipose tissue releases NEFA, and requires a supply of plasma albumin for the transport of these NEFA into the circulation. After feeding, there is a need to increase substrate delivery for TG clearance. Adipose tissue blood flow (ATBF) is increased in states of fat mobilization (fasting and prolonged exercise) and fat deposition (postprandial period). In all these states, the increase in ATBF appears to be related to the metabolic activity of the tissue.

The physiological significance of the nutrient-related increase in ATBF is not completely understood. It is interesting that TG extraction from blood, considered primarily to reflect LPL activity increases in parallel with raised blood flow when increased by adrenaline infusion.(Samra *et al.* 1996b) This may imply that TG extraction in adipose tissue is limited by substrate delivery. During that study, a rise in net NEFA efflux was also found, representing NEFA generated by the increase rate of LPL action and by activation of HSL. However, the peak in ATBF after a normal meal is early, and does not seem to be temporally co-ordinated with the later peak in plasma TG concentration, LPL action or adipose tissue fat deposition but more with increase in insulin concentration and suppression of NEFAs after a mixed meal.(Carpentier *et al.* 2007; Coppack *et al.* 1992) The increased postprandial blood flow might serve to deliver a signal, such as insulin, to initiate the postprandial increase in LPL activity. Insulin also suppresses NEFAs, which have been shown to impair the vasodilatory response.(Steinberg *et al.* 1997) Obviously, compared with skeletal muscle, the environment within adipose tissue is subject to much larger fluctuations in NEFA concentration. Thus, if the physiological relationship between fluctuation in NEFA concentrations and blood flow exists, adipose tissue would be the primary organ for such regulation.

Secondly, impaired regulation of ATBF has been linked to obesity and insulin resistance.(Jansson, Larsson, A., and Lonnroth, P. N. 1998; Karpe *et al.* 2002c; Summers, Samra, J. S., and Frayn, K. N. 1999) Reduced basal ATBF and blunted postprandial rise of ATBF in insulin resistant obese subjects may decrease chylomicron-TG delivery to adipose tissue LPL in the postprandial period. It results in higher chylomicron-TG concentrations for a longer period after meals in these subjects. This will lead in turn to increased production of atherogenic particles. It could be proposed that impaired postprandial vasodilation, a

potential feature of glucose intolerance,(Karpe *et al.* 2002c) is also the cause of the impaired lipid metabolism in insulin resistant subjects and predisposes to CVD. Dimitriadis *et al.* demonstrated that after meal ingestion, insulin-stimulated ATBF was decreased in insulin impaired glucose tolerance subjects as well as in diabetics who had postprandial hyperglycemia but normal fasting plasma glucose levels, and subjects with type 2 diabetes with both postprandial and fasting hyperglycemia.(Dimitriadis *et al.* 2007) Which is completely the opposite of an efficient postprandial response to food intake. Moreover, it has been shown that those defects can be observed early in the natural history of type 2 diabetic.(Brassard *et al.* 2008) Nevertheless, this very interesting experiment pointed out the fact that the decrease in ATBF seems to come proportionally with the insulin sensitivity level. This defect could be considered as an early marker of insulin resistance that precedes the development of type 2 diabetes.

Thirdly, the important endocrine functions of adipose tissue (discussed above) may be facilitated by variations in the inflows and the outflows from the tissue, which demonstrate the central role of ATBF in the adipose tissue physiology.

ATBF PHYSIOLOGY

ATBF variations during fasting and meals

After an overnight fast, abdominal ATBF is typically around 3-5 ml.100 g tissue⁻¹.min⁻¹, whereas in resting skeletal muscle the value is about 1.5 ml.100 g tissue⁻¹.min⁻¹.(Elia and Kurpad, A. 1993) Skeletal muscle blood flow can increase many-fold (perhaps 20-fold) during exercise. ATBF is also very adaptable. In some lean, healthy subjects subcutaneous abdominal blood flow increases several-fold (up to 4-fold) in response to a meal.(Bülow *et*

al. 1987a; Karpe *et al.* 2002c; Karpe *et al.* 2002a; Samra *et al.* 1995; Summers *et al.* 1996; Summers *et al.* 2001) There are similar increases in thigh and forearm ATBF in response to feeding.(Bülow *et al.* 1987a; Romanski, Nelson, R. M., and Jensen, M. D. 2000; Simonsen *et al.* 1990) ATBF increases steadily during the night, presumably reflecting duration of fasting.(Hagstrom-Toft *et al.* 1997) Extending an overnight fast of 14 hours to 22 hours causes no significant changes in flow,(Klein *et al.* 2000) but fasting prolonged to 72 hours increases further blood flow for about 1.5-fold.(Patel *et al.* 2002) Thus, it appears that there is some minimum value for ATBF at rest in a late postprandial state: blood flow increases as fasting continues, or during exercise or also when a meal is eaten, as demonstrated by the increased ATBF following a 75g of glucose ingestion concomitantly with the fall of plasma NEFA concentration.(Karpe *et al.* 2002a) In all these states, the increase in ATBF may be related to the metabolic activity of the tissue. During fasting or during exercise, adipose tissue releases NEFA, and requires a supply of plasma albumin for transport of these NEFA into the circulation. After feeding, there is a need to increase substrate delivery for triglyceride clearance. When ATBF was increased by infusion of adrenaline, triglycerides extraction from the blood to adipose tissue increased exactly in parallel with increased blood flow,(Samra *et al.* 1996b) implying that triglycerides extraction is normally limited by substrate delivery.

In healthy normal weight subjects, abdominal ATBF increases two- or three-fold in response to nutritional stimuli. The peak is expected at about 30 to 60 min following oral glucose ingestion(Bülow *et al.* 1987b; Karpe *et al.* 2002c) or a mixed meal,(Coppack *et al.* 1992; Karpe *et al.* 1998) whereas ingestion of fat alone does not elicit a blood flow response, showing that sense at the level of the gastrointestinal tract may be involved.(Evans, Clark, M. L., and Frayn, K. N. 1999; Summers *et al.* 2001) ATBF is identical in men and women at

the abdomen level but may be higher in the postprandial period in the female thigh.(Romanski, Nelson, R. M., and Jensen, M. D. 2000)

ATBF in relation with the weight

Fasting ATBF and its increase after oral glucose are impaired in insulin-resistant subjects, such as those who are obese or have type 2 diabetes.(Coppack *et al.* 1990a; Jansson *et al.* 1992; Romanski, Nelson, R. M., and Jensen, M. D. 2000) ATBF may be influenced by obesity and glucose intolerance by different modes of action.

Fasting ATBF is negatively correlated with BMI, as is the postprandial rise in ATBF.(Summers *et al.* 1996) However, obesity only explains a part of the rather high variability in postprandial regulation of ATBF seen between subjects. Other factors determine ATBF responsiveness to nutrients. It has been shown, with a cross sectional study,(Karpe *et al.* 2002c) that the primary determinant of responsiveness is not obesity *per se* but the associated insulin resistance, in particular the adipose tissue insulin sensitivity, reflected through a novel insulin sensitivity index based on NEFA suppression and postprandial glucose and insulin concentrations.(Belfiore, Iannello, S., and Volpicelli, G. 1998) No studies have been conducted on the effects of long-term weight loss and weight maintenance on ATBF. Only short-term studies, in a context of drastic weight loss, can be found in the literature. For example, it has been reported that water content, a potential reflection of nutritive blood flow,(Laine *et al.* 1998; Raitakari *et al.* 1997) was increased after a 15.6-kg-in-9-week weight loss, suggesting that improved insulin sensitivity may contribute to improve ATBF.(Laaksonen *et al.* 2003)

ATBF in relation with exercise

In humans the efficient role of exercise on weight and insulin sensitivity of both whole body and muscle is well established.(Henriksen 2002) However, the role of fitness or physical activity on ATBF has not been thoroughly assessed and the results are inconsistent. ATBF rises during moderate-intensity exercise (4 to 6 hours).(Bülow 1981; Stallknecht *et al.* 2001) Surprisingly, ATBF did not increase in non-trained young men (22.3 ± 1.5 yr) who performed two rounds of 60 min on a bicycle,(Stich *et al.* 2000) nor in older women (75 yr).(Lange *et al.* 2002)

The effect of long-term exercise on ATBF is also controversial. Only three studies have been published on that topic. One study shows that 16 weeks of cycle exercise training did not affect ATBF despite improved $VO_2\text{max}$, in five healthy untrained men.(Horowitz *et al.* 1999) Another study comparing eight endurance-trained and eight sedentary young men showed that ATBF in trainees was not significantly higher than sedentary subjects.(Stallknecht *et al.* 2000) Finally, eleven obese non-diabetic males taking part in a 12-week aerobic training program improved their $VO_2\text{max}$ but failed to improve ATBF.(Stich *et al.* 1999) However, long-term exercise is clearly associated with improvement in insulin sensitivity(Henriksen 2002; Houmard *et al.* 2004) and impaired regulation of ATBF seems to be another facet of the insulin resistance syndrome.(Karpe *et al.* 2002c) It can be concluded that further studies in this area are needed. Moreover, because plasma fatty acid concentrations increase dramatically immediately after intense exercise, it has been hypothesized that the reduction in fatty acid release into the circulation might result from a restriction in ATBF,(Hodgetts *et al.* 1991) mediated by catecholamine-stimulated vasoconstriction in adipose tissue blood vessels. In addition, endurance-trained athletes have

a greater ATBF in response to epinephrine infusion compared with sedentary control subjects.(Stallknecht *et al.* 1995) Therefore, catecholamine delivery to adipose tissue might be greater during exercise.

ATBF changes in other physiological situations

The change from upright to supine position elicits an instantaneous ATBF increment, in accordance with a decrease in central and local postural sympathetic vasoconstrictor activity.(Sindrup *et al.* 1991) The sitting position also decreases ATBF, in the anterior tibial muscle.(Balldin 1976) During sleep, approximately 90 minutes after start of sleeping, a blood flow increment of considerable magnitude is observed for 100 minutes.(Sindrup *et al.* 1991) It has also be reported that mental stress(Fernqvist and Linde, B. 1988) or bladder filling(Fagius and Karhuvaara, S. 1989) increase ATBF. All these physiological modulations have in common that they may be regulated by sympathetic tone.

VASOACTIVE REGULATORS IN THE FASTING AND POSTPRANDIAL STATE

Over the last decade, adipose tissue has been increasingly recognized as a complex organ with a host of endocrine and paracrine effects that affect an array of metabolic and other functions in the organism.(Mohamed-Ali, Pinkney, J. H., and Coppack, S. W. 1998) ATBF is a dynamic aspect of adipose tissue function. This parameter is disturbed in obesity and this disturbance of ATBF regulation has been shown to be closely associated with insulin resistance.(Jansson, Larsson, A., and Lonnroth, P. N. 1998; Karpe *et al.* 2002c; Summers *et al.* 1996; Virtanen *et al.* 2002) ATBF regulation in the postprandial period might well be an essential component of normal adipose tissue metabolic function; for instance, a raised in ATBF leads to increased clearance of TG by the tissue.(Samra *et al.* 1996b) It might also be

a further aspect of disturbed endothelial function in obesity. Regulation of ATBF has been studied extensively and reviewed by Frayn and Macdonald.(Frayn *et al.* 2003)

Sympathetic nervous system

Sympathetic stimulation increases vascular permeability within adipose tissue.(Rosell, Axelrod, J., and Kopin, I. J. 1964) This does not occur in other tissues such as skin or skeletal muscle. This increase in permeability is inhibited by α -receptor blocking agents. It has been suggested that the endothelial cells of the vessels within adipose tissue may carry α -receptors that when stimulated, cause contraction of cells and increase the pore size between endothelial cells. Even during sympathetic induced vasoconstriction, the product of permeability and capillary surface area for solutes is increased (figure 1).(Fredholm and Sollevi, A. 1981) This may have important implications for the metabolic processes within the tissue. Moreover, enhancement of ATBF may have importance in metabolic physiology in that the extraction of plasma triglycerides increases with increasing blood flow.(Samra *et al.* 1996b) The increase in postprandial ATBF is much more important with oral glucose administration than with intravenous glucose administration.(Karpe *et al.* 2002c) In humans, adrenergic influences are predominant, with β -mediated vasodilation(Hjemdahl *et al.* 1983) and α_2 -mediated vasoconstriction (figure 1).(Galitzky *et al.* 1993) These influences may explain the increased blood flow during fasting or exercise that circulating catecholamines are more important in the exercise-induced increase in ATBF than sympathetic nerve activity (figure 1).(Stallknecht *et al.* 2001)

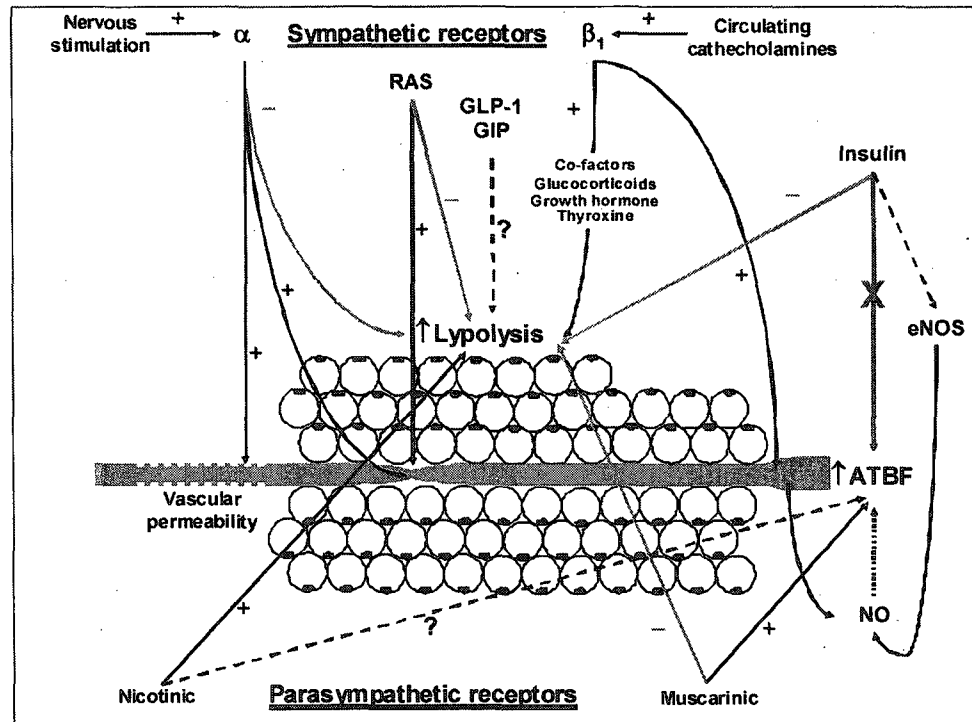


Figure 1: Hypothetic mechanism schema of the regulation of adipose tissue blood flow in human.

The increase in blood flow following feeding has not been fully explained. Time course of insulin concentration in plasma does not seem to be the responsible signal.(Karpe *et al.* 2002a; Summers *et al.* 1996) Also, adrenaline and noradrenaline levels were observed to increase in response to ingestion of oral glucose and might be related to the increased ATBF stimulated by glucose.(Bülow *et al.* 1987a) Links between splanchnic bed glucoreceptors and the sympathoadrenal system have been hypothesized in mammals and may therefore account for a difference in blood flow response between the experimental procedures.(Donovan, Cane, P., and Bergman, R. N. 1991) Sympathetic receptor blockers have been shown to reduce the postprandial response by 55%, making it a strong candidate as a regulator. Gut hormones may also be responsible, but their role in vasodilation remains unclear and needs to be clarified. The incretin's system could be part of the explanation. An obvious candidate is glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) (figure 1). GLP-1 is the most important incretin in

humans.(Ahren 2003; Meier *et al.* 2002) GLP-1 receptors have been detected in adipose tissue. Moreover, GLP-1 is secreted throughout the day and in increased amounts after meals. From baseline, GLP-1 increases by 120% after glucose load.(Rask *et al.* 2004) In addition, it has been shown that GLP-1 has a vasodilatory effect in hepatic and pulmonary arteries and it has been demonstrated that GLP-1 mediate a concentration dependent vasorelaxation of rats aorta.(Joyner and Norton, C. C. 1976; Golpon *et al.* 2001; Green *et al.* 2008) As β -adrenoceptor subtypes, this receptor belongs to the superfamily of seven transmembrane domain G protein-coupled receptors that positively regulate intracellular cAMP levels via adenylate cyclase.(Bertin *et al.* 2001) One study was performed in humans to test directly whether GLP-1 has actions on lipolysis in adipose tissue and was inconclusive, probably because the ethanol escape technique under microdialysis condition was used.(Bertin *et al.* 2001; Lafontan and Arner, P. 1996) This technique only gives an estimation of ATBF, and is considered as an indirect and a non-quantitative method.(Karpe *et al.* 2002b) The role of GLP-1 on ATBF regulation remains to be established. C-peptide, a hormone which is derived from the catabolism of pro-insulin has been shown to have some vasodilatory properties in cutaneous tissue by stimulating eNOS activity,(Wahren *et al.* 2000) is not likely to be a candidate for the postprandial increase in ATBF since its plasma concentration decreased during a intravenous euglycaemic insulin-glucose regimen.(Karpe *et al.* 2002a) There is also abundant evidence that β -adrenergic stimulation increases ATBF. This may be induced, for instance, by adrenaline infusion(Samra *et al.* 1996a) or by local delivery of β -adrenergic stimuli by microdialysis of the tissue using isoprenaline, dobutamine,(Barbe *et al.* 1996) or isoproterenol.(Millet *et al.* 1998) In contrast, experiments using α -adrenergic stimuli such as clonidine(Galitzky *et al.* 1993) and norfenefrine(Flechtner-Mors *et al.* 2002) show a predominantly inhibitory effect of α -

adrenoceptors on ATBF. It has been previously shown that the degree of insulin sensitivity seems to be closely related to ATBF responsiveness, (Karpe *et al.* 2002c) but insulin per se does not seem to stimulate blood flow in adipose tissue (Karpe *et al.* 2002a) as it may do in muscle. (Baron *et al.* 2000) We have shown that the postprandial increase in insulin concentrations may lead to activation of the sympathetic nervous system, with a subsequent enhancement of ATBF. (Karpe *et al.* 2002a) We also observed, using microinfusion technique, that propranolol, a β -adrenoceptor antagonist, had no effect on ATBF during the preprandial period. (Ardilouze *et al.* 2004) The blood flow response to feeding is completely blocked in some depots and partially blocked in other by propranolol infusion, a β -receptor antagonist, (Ardilouze *et al.* 2004; Simonsen *et al.* 1990) suggesting that it is dependent upon sympathetic activation induced by postprandial hyperinsulinemia.

Moreover, it has been shown that phentolamine, a non-specific α_1 -adrenoceptor antagonist, promoted an increase of the fasting blood flow during the preprandial period, (Stich *et al.* 2003) a finding that is in agreement with studies using microdialysis in which clonidine (an α_2 -adrenoceptor agonist) induced vasoconstriction and inhibited lipolysis, (Galitzky *et al.* 1993) suggesting the vasoconstricting role of α -adrenoceptors (figure 1). Furthermore, the effects of yohimbine, a specific α_2 -adrenoceptor antagonist, are greater and sustained compared to those of phentolamine in inhibiting ATBF, suggesting that α_2 -adrenoceptor activation leads to vasoconstriction and that α_1 -receptors have little effect in the adipose tissue microcirculation. (Ardilouze *et al.* 2004) We can therefore conclude that α_2 -adrenoceptor is the main vasoconstrictor in the preprandial period, whereas the β -adrenoceptor has no preprandial effect, but has a strong regulation role according to its postprandial vasodilator effect.

Parasympathetic nervous system

Parasympathetic denervation of adipocytes results in decreased insulin-mediated glucose and free fatty acid extraction as well as increased hormone-sensitive lipase (HSL) activity.(Kreier *et al.* 2002) Moreover, it has been demonstrated, in rats, that adipose tissue receives vagal input and that this input has an anabolic role on adipose tissue. Namely, insulin sensitivity improves and glucose and lipid uptake increase with parasympathetic stimulation,(Kreier *et al.* 2002) supporting the concept that white adipose tissue is under dual autonomic control;(Kreier *et al.* 2003) the sympathetic controlling catabolic processes, and the parasympathetic controlling anabolic processes, like most peripheral tissues.(Bartness 2002) Although some found neither nicotine nor carbachol, muscarinic receptor agonist, to have any measurable effect on ATBF,(Andersson and Arner, P. 2001) others found that mecamlamine blocked the stimulatory effects of nicotine on lipolysis (figure 1).(Andersson and Arner, P. 1995) Lipolysis and ATBF are linked as shown by the parallel increase of ATBF and lipolysis following insulin injections.(Samra *et al.* 1996b) This would suggest that mecamlamine blocks the effects of nicotine on ATBF. It was also found that nicotinic receptor stimulation increases lipolysis in humans, whereas muscarinic receptor stimulation decreases lipolysis, suggesting their ability to modulate ATBF. Nervertheless, all of these findings were obtained using the ethanol escape technique under microdialysis condition, a method which has been described as rather insensitive for measurement of ATBF.(Karpe *et al.* 2002b) As such, it is important to document the role of the parasympathetic system in the modulation of ATBF using the microinfusion technique.

Insulin

Has it was shown, insulin infusion increase blood flow,(Laakso *et al.* 1990) thereby showing insulin to be an hormone with vascular effects. ATBF seems to exhibit its highest degree of

modulation in response to food intake, illustrated by either glucose(Bülow *et al.* 1987a) or mixed-meal(Coppack *et al.* 1992) ingestion, whereas fat alone does not elicit a blood flow response.(Evans, Clark, M. L., and Frayn, K. N. 1999) The actual stimulus for this nutrient-related increase in ATBF is, however, not fully understood, but the postprandial increase in ATBF coincides with the increase in insulin concentration in plasma and with the suppression of NEFAs.(Coppack *et al.* 1992) Postprandial increases in ATBF suggest that systemic increases in insulin also stimulate increased blood flow.(Karpe *et al.* 2002a) Moreover, very high concentrations of insulin seem to induce a NO-mediated vasodilation in skeletal muscle,(Steinberg *et al.* 1994) through an insulin-mediated increase of eNOS expression (figure 1).(Kuboki *et al.* 2000) Using the local microinfusion technique of pharmacological or hormonal agents,(Larsen, Lassen, N. A., and Quaade, F. 1966) it was shown that local delivery of insulin directly into the tissue, without increasing the systemic insulin concentration, did not change the blood flow within the tissue, and it was therefore concluded that insulin by itself is unlikely to be the mediator of the enhanced blood flow seen in the postprandial state.(Karpe *et al.* 2002a) One of the mechanisms by which insulin mediates blood flow action is upon endothelial cells, which are key to the regulation of vascular tone, through the insulin receptor present on blood vessels,(Jialal *et al.* 1985) stimulating production and release of endothelin-1 (ET-1) and NO.(Vicent *et al.* 2003) The elevated insulin levels of insulin resistant subjects, as well as acute endogenous and exogenous insulin elevations in normal controls and insulin resistant subjects, have been shown to be related to elevated levels of circulating ET-1, thus reinforcing the link between insulin and ET-1 production and release.(Mather, Anderson, T. J., and Verma, S. 2001)

On the other hand, insulin also suppresses NEFA, which have been shown to impair the vasodilatory response by impairing endothelial function in skeletal muscle. Therefore, the

elevated levels of NEFA observed in insulin resistance syndrome could be the cause to the endothelial dysfunction.(Steinberg *et al.* 1997) Obviously, compared with skeletal muscle, the environment within adipose tissue is subject to much larger fluctuations in NEFA concentration. Thus, if the physiological relationship between fluctuation in NEFA concentrations and blood flow exists, adipose tissue would be the primary organ for such regulation. However, direct infusion of insulin in adipose tissue does not affect ATBF. May be because such a concentration of insulin certainly would reduce the NEFA levels, and therefore it can be deduced that this reduction had no effect on ATBF.

Nitric oxide

The formation of nitric oxide (NO) has been demonstrated in human adipocytes and preadipocytes.(Andersson *et al.* 1999; Ribiere *et al.* 1996) NO is released in white adipose tissue by preadipocytes, adipocytes, vascular endothelial cells, and vascular smooth muscle cells.(Gaudiot *et al.* 2000; Linz *et al.* 1999; Ribiere *et al.* 1996) The enzymes responsible are endothelial NO synthase (eNOS) in vascular endothelial cells and adipocytes as well as the inducible NO synthase (iNOS) in all cell types when appropriately stimulated. There is a constitutive expression of iNOS, although at low levels, in white adipose tissue. *In vitro*, NO formation in adipose tissue is upregulated by lipopolysaccharides, cytokines such as TNF- α and interferon- γ , noradrenalin, insulin and angiotensine (Ang) II.(Hennington *et al.* 1998) NO can activate soluble guanylate cyclase, resulting in cGMP formation(Gaudiot *et al.* 2000) and the subsequent cGMP-dependant protein kinases signal explain the biological effects of NO.(Ignarro 2002) Moreover, mRNA expression of several subunits of the soluble guanylylcyclase and the two isoforms of the cGMP-dependant protein kinase was reported in isolated human adipocytes and preadipocytes.(Engeli and Sharma, A. M. 2000)

Moreover, it has been shown that high concentrations of NO inhibit lipolysis stimulated by different pathways, depending on the NO species (NO^+ , NO^\bullet , NO^-). NO^+ increases basal lipolysis, whereas NO^\bullet and NO^- show no effect on basal lipolysis. Low levels of intracellular NO, on the other hand, are necessary for both basal and stimulated lipolysis, because they keep protein kinase A in an active state due to NO's antioxidant-related properties.(Gaudiot *et al.* 2000) NO is also responsible for blunting the TNF- α -stimulated lipoprotein lipase (LPL)-activity and uncoupling protein-2 (UCP2) expression. Thus NO appears to function to keep adipocytes in their present status, inhibiting lipolysis and energy dissipation as well as lipogenesis. In addition to its effects on adipocytes, NO is a strong vasodilator in vascular smooth muscle cells(Linz *et al.* 1999) and takes part in signaling processes leading to angiogenesis in vascular endothelial cells.(Pedram, Razandi, M., and Levin, E. R. 2001)

In concert with the blood flow regulation in many other tissues, NO could be a major vasodilator in adipose tissue, or possibly a direct or indirect mediator of insulin vasodilation.(Steinberg *et al.* 1994) After a NO-mediated vasodilation was described during an euglycaemic hyperinsulinemic clamp giving high concentrations of insulin,(Steinberg *et al.* 1994) it has been shown *in vitro* that e-NOS is regulated at the level of expression and activity by insulin.(Kuboki *et al.* 2000) However, it has been pointed out that the vasodilatory effect of insulin occurs only at pharmacologic insulin doses.(Yki-Järvinen and Utriainen, T. 1998) However, NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), an NO synthase inhibitor, did not seem to alter local ATBF(Andersson *et al.* 1999) and attenuated the isoproterenol-induced vasodilation(Jordan *et al.* 2001) only during adipose tissue microdialysis, suggesting that NO was not a mediator of ATBF. These measurements were made by use of the ethanol outflow/inflow ratio, which has an inherently low

sensitivity.(Karpe *et al.* 2002b) However, using microinfusion, it was shown, in agreement with the well-established vasodilatory effect of NO in other tissues, that L-NMMA has a vasoconstrictor effect in the preprandial period.(Ardilouze *et al.* 2004) Enhancement in ATBF has been shown to be independent of NO, but that NO activity determines the level from which this response takes place (figure 1).(Ardilouze *et al.* 2004) Therefore, NO seems to determine the absolute level of ATBF, whereas a major proportion of the postprandial enhancement of ATBF is under β -adrenergic regulation. It is interesting to note that thiazolidinediones, insulin sensitizing agents, both enhance resting ATBF(Tan *et al.* 2005) and flow-mediated vasodilation in people with insulin resistance,(Caballero *et al.* 2003; Wang *et al.* 2004) whereas rosiglitazone does not appear to improve flow-mediated vasodilation in coronary patients without diabetes mellitus.(Sidhu, Cowan, D., and Kaski, J. C. 2004) This might suggest a common mechanism for increasing NO bioavailability in response to insulin sensitization. It was also recognized that NO has acute vasodilatory and antithrombotic effects and at a longer term, anti-atherosclerotic effects through impaired vascular smooth muscle cells (VSMC) migration and proliferation.(Cooke and Dzau, V. J. 1997)

Still, the lack of postprandial ATBF responsiveness in insulin resistance remains unexplained. One possible explanation is the increased sympathetic drive seen in chronic hyperinsulinaemia. It was demonstrated that SNS overactivity, associated with heart failure, can increase oxidative stress.(Hayden and Tyagi, S. C. 2003) Normally, insulin causes physiologic vasodilation by increasing the local production of endothelium-dependent NO.(Scherrer and Sartori, C. 1997) However, the SNS overactivity promotes proliferation of oxygen free radicals that can consume NO, blunting normal insulin-mediated vasodilation. Even individuals without diabetes but with impaired fasting glucose demonstrate

significantly lowered endothelium-dependent vasodilation compared with control subjects.(Vehkavaara *et al.* 1999)

Renin angiotensin system

Renin angiotensin system (RAS) is a major player in the vascular tone and it is not impossible that RAS can also have some implications in ATBF regulation. Angiotensin peptides are cleaved from circulating angiotensinogen produced in the liver. Several proteins of the classic RAS are also produced in adipose tissue. These include renin, angiotensinogen, Ang I, Ang II, Ang type 1 (AT₁) and type 2 (AT₂) receptors, Angiotensin converting enzyme (ACE), and other proteases capable of producing Ang II like chymase, cathepsins D and G and tonin.(Engeli *et al.* 2003; Trayhurn and Beattie, J. H. 2001) The first peptide to emerge is Ang I, which is devoid of biological activity. It can be cleaved to Ang II by ACE, which is present on preadipocytes, adipocytes, vascular endothelial cells, and vascular smooth muscle cells, or to Ang 1-7 by neutral endopeptidase, which is expressed on vascular endothelial cells.(Engeli, Negrel, R., and Sharma, A. M. 2000) Ang 1-7 stimulates vascular endothelial cells to secrete NO and prostacyclin, leading to vasodilation, possibly by potentiating the action of kinins.(Linz *et al.* 1999) In addition to hepatic angiotensinogen production, adipocytes have also shown to be an important source of Ang II precursor, one of the major vasoconstrictive and proatherogenic peptide.(Fruhbeck *et al.* 2001; Lavoie and Sigmund, C. D. 2003; Safonova *et al.* 1997; Trayhurn and Beattie, J. H. 2001) The expression of angiotensinogen, ACE and AT₁ receptors is higher in visceral adipose tissue compared to subcutaneous adipose tissue.(Engeli *et al.* 2003; Goossens, Blaak, E. E., and van Baak, M. A. 2003) Consequently, a role in local ATBF and fatty acid re-esterification rates have been suggested for angiotensinogen. Furthermore, components of the RAS such as

angiotensinogen and Ang II are induced during adipogenesis. Moreover, Ang II promotes adipocyte growth and differentiation, both directly by promoting lipogenesis and indirectly by stimulating prostaglandin synthesis.(Engeli *et al.* 2003) Ang II from mature adipocytes, however, may inhibit further recruitment of preadipocytes.(Engeli *et al.* 2003) Some lipophilic angiotensin receptor blockers (ARBs) appear to induce PPAR γ activity in adipose tissue. Therefore, the type 2 diabetes protection observed after RAS inhibition may be partially linked to a thiazolidinedione-like effect.(Towfighi and Ovbiagele, B. 2008; Tuck and Corry, Dalila B 2005) TNF- α , an inducer of angiotensinogen in hepatocytes, is elevated in hyperinsulinemic, obese individuals and may provide a link in mediating insulin upregulation of the RAS in adipose tissue. Furthermore, thiazolidinediones lower blood pressure *in vivo*, and downregulation of the RAS in adipose tissue may contribute to this effect.(Harte *et al.* 2005) Although Ang II is best known for its role in the regulation of vascular tone, aldosterone secretion from adrenal gland and sodium and water reabsorption from the kidney, all of which contribute to blood pressure regulation, it can also affect cell growth and differentiation.(Engeli *et al.* 2003) Thus, the adipose tissue RAS is a potential link between obesity and hypertension. Ang II stimulates the prostacyclin production and release, which in turn is a factor that participate in the induction of preadipocytes differentiation to mature adipocytes.(Zorad *et al.* 1995) In contrast, Ang II has been shown to inhibits adipose conversion of preadipocytes.(Schling and Loffler, G. 2001) There is some evidence showing that the expression of angiotensinogen is regulated by nutritional and hormonal factors. Thus, it was previously demonstrated that angiotensinogen expression increased in obesity and appear to be regulated by the nutritional status with a decrease mRNA levels during fasting and an increase upon refeeding and these changes are accompanied by parallel changes in blood pressure. Consequently, a role in local ATBF and

fatty acid re-esterification rates has been suggested for angiotensinogen. Angiotensin II binds receptors on not only adipocytes but also stromavascular cells and nerve terminals, thus affecting adipose tissue physiology by altering blood flow and SNS activity.(Engeli *et al.* 2003) Angiotensin II inhibits lipolysis, promotes lipogenesis, decreases insulin-dependent glucose uptake and increases hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis (figure 1).(Engeli *et al.* 2003) Furthermore, adipose tissue RAS regulates the expression of adipose tissue-derived endocrine factors including prostacyclin, NO, PAI-1 and leptin.(Engeli *et al.* 2003; Goossens, Blaak, E. E., and van Baak, M. A. 2003) Inhibition of the RAS, either by ACE inhibition or AT₁ antagonism, decreases weight and improves insulin sensitivity in rodents. Furthermore, because Ang II can inhibits adipogenic differentiation of human adipocytes via AT₁ receptors, it has been hypothesised that RAS blockade may prevent diabetes by promoting the recruitment and differentiation of adipocytes. Some lipophilic angiotensin receptor blockers (ARBs) appear to induce PPAR γ activity in adipose tissue. Therefore, the type 2 diabetes protection observed after RAS inhibition may be partially linked to a thiazolidinedione-like effect.(Towfighi and Ovbiagele, B. 2008) TNF- α , an inducer of angiotensinogen in hepatocytes, is elevated in hyperinsulinemic, obese individuals and may provide a link in mediating insulin upregulation of the RAS in adipose tissue. Furthermore, thiazolidinediones lower blood pressure *in vivo*, and downregulation of the RAS in adipose tissue may contribute to this effect.(Harte *et al.* 2005)

Effectively, in addition to NO, RAS is involved in the regulation of fasting ATBF. Angiotensin II induces tonic vasoconstriction in adipose tissue *via* interaction with the AT₁ receptor. However, locally produced Ang II did not appear to regulate ATBF; only circulating Ang II was a regulator of fasting ATBF, and the major proportion of Ang II-

induced vasoconstriction was NO independent.(Masegosa *et al.* 1992) Furthermore, as NO, Ang II has no major effect on the postprandial enhancement of ATBF.(Masegosa *et al.* 1992)

Moreover, Ang II is known to potentiate the inhibitory effects of NEFA on insulin-mediated glucose uptake and systemic blockade of the RAS by inhibition of the ACE, has been shown to improve insulin sensitivity and possibly prevent the development of type 2 diabetes.(Hansson *et al.* 1999) In addition to its well-known vasoconstricting effect, Boschmann *et al.* showed that Ang II inhibits lipolysis and glucose uptake in adipose tissue.(Boschmann *et al.* 2001) They also demonstrated that abdominal fat depots seem to be more sensitive to these effects of Ang II than femoral adipose tissue during stimulation with isoproterenol, whereas under baseline conditions, femoral fat depots seem to be more sensitive to Ang II.(Boschmann *et al.* 2001) Moreover, Ang II induces many vascular effects besides vasoconstriction such as vascular remodeling and plaque rupture.(Schiffrin 2002) Therefore, a role for local Ang II beyond its classical systemic effect on blood pressure regulation link adipose tissue mass enlargement with hypertension via angiotensinogen production. Furthermore, we should keep in mind that a large part of the growth and inflammatory responses of Ang II are mediated by oxidative stress stimulation. Monocyte/macrophage adhesion and accumulation are prevented by NO, which is counterbalanced by Ang II, probably by the generation of reactive oxygen species (ROS).(Lyon, Law, R. E., and Hsueh, W. A. 2003) Therefore, an imbalance between Ang II and NO leads endothelial dysfunction with lost of vasodilator capacity, an increased monocyte/macrophage infiltration and the increase of pro-coagulant activity in the vessel.

Other vasoactive regulators

Kinins are derived from kininogen by the action of kallikrein. It is still unresolved whether kininogen and kallikrein are acquired from the circulation or if they are locally produced. The circulating kallikrein kinin system can be activated on vascular endothelial cells, but studies with rat adipocytes also indicate a local production. Kinins elicit NO and prostacyclin secretion from vascular endothelial cells and are therefore potent vasodilators.(Linz *et al.* 1999) They also increase the permeability of the endothelium and lead to marked enhancement of the insulin sensitivity of adipocytes.(Caldiz and de Cingolani, G. E. 1999) The presence of circulating RAS components makes kinins as potential vasoactive regulators in ATBF.

Endothelin is produced in vascular endothelial cells through cleavage of proendothelin to big endothelin and subsequent conversion to endothelin by endothelin-converting enzyme.(Kentsch and Otter, W. 1999) Endothelin-1 (ET-1) is a peptide of 21 amino acid residues, the most potent vasoconstrictor substance known.(Camarda *et al.* 2002) ET-1 release is stimulated by angiotensin II, antidiuretic hormone, thrombin, cytokines, ROS, calcium ions, adrenergic receptors, various cytokines and shearing forces acting on the vascular endothelium. Insulin has been shown to directly stimulate ET-1 gene transcription in endothelial cells.(Oliver *et al.* 1991) ET-1 release is inhibited by NO, as well as by prostacyclin and atrial natriuretic peptide (ANP). The vascular endothelium is the most abundant source of ET-1 *in vivo*(Masaki 2000) and endothelin is secreted mainly abluminally and acts in a paracrine and autocrine fashion on cells in its immediate vicinity.(Kentsch and Otter, W. 1999) VSMC respond with long-lasting constriction, whereas vascular endothelial cells react with short-term release of NO and prostacyclin, although vasoconstriction predominates in adipose tissue vasculature. Endothelin is a strong inhibitor of preadipocyte

differentiation (Hauner, Petruschke, T., and Gries, F. A. 1994) and induces insulin resistance in adipocytes. (Shih, Kwok, C. F., and Ho, L. T. 2000)

CONCLUSION

Studies on human adipose tissue using adipose arteriovenous differences, microdialysis, ¹³³Xenon washout, tracer techniques and biopsies have established that adipose tissue is metabolically active and that ATBF is of primordial importance in the accomplishment of adipose tissue metabolic activities. Increase in ATBF (i.e. vasodilatation), is associated with a) plasma TG and NEFA extraction (for storage in adipocytes) during the postprandial period and b) NEFA release during postabsorptive state and fasting. It is well established that in obese and/or insulin-resistant individuals, fasting ATBF is lower than in healthy normal-weight subjects whereas the increase in postprandial ATBF is blunted i.e. ATBF enhancement peaks by less than 50% above baseline blood flow, (Coppack *et al.* 1992; Bülow *et al.* 1987a; Blaak *et al.* 1995; Jansson, Larsson, A., and Lonnroth, P. N. 1998) influencing on the efficacy of adipose tissue metabolic activities. As a result, several evidences and hypothesis have emerged linking obesity, insulin resistance and CVD to metabolic disorders. One hypothesis is that in obesity an impaired postprandial ATBF response generates atherogenic lipoprotein particles, leading to CVD. Another hypothesis states that impaired buffering of postprandial NEFA fluxes by adipose tissue leads to accumulation of TG in skeletal muscle, liver and pancreatic β -cells, leading to insulin resistance and impaired insulin secretion.

Nevertheless, the complex interaction between all these regulators, justify more work on these topic to ascertain the real role of adipose tissue blood flow in insulin resistance and

other associated pathologies. Thus, the regulation of ATBF is complex and still not fully understood. In the actual context of world obesity epidemic, it is essential to pursue the research on ATBF regulation for a better understanding of the mechanisms of insulin resistance syndrome development to diabetes and cardiovascular diseases. A systems biology approach incorporating genomics, proteomics, metabolomics and integrative physiology into *in vivo* adipose tissue studies will clarify the links between adipose tissue and vascular disease and raised the physiological importance of ATBF regulation in the general metabolic homeostasis.

REFERENCES

- Ahren, B. 2003. Gut peptides and type 2 diabetes mellitus treatment. *Curr. Diab. Rep.* **3**(5): 365-372.
- Andersson, K. and Arner, P. 1995. Cholinoceptor-mediated effects on glycerol output from human adipose tissue using in situ microdialysis. *Br. J. Pharmacol.* **115**(7): 1155-1162.
- Andersson, K. and Arner, P. 2001. Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **25**(8): 1225-1232.
- Andersson, K., Gaudiot, N., Ribiere, C., Elizalde, M., Giudicelli, Y., and Arner, P. 1999. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **126**(7): 1639-1645.
- Ardilouze, J.L., Fielding, B. A., Currie, J. M., Frayn, K. N., and Karpe, F. 2004. Nitric oxide and beta-adrenergic stimulation are major regulators of preprandial and postprandial subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. *Circulation* **109**(1): 47-52.
- Balldin, U.I. 1976. The effects of body position and a vasodilator on xenon133 elimination from human subcutaneous fat. *Undersea Biomed. Res.* **3**(4): 379-385.
- Barbe, P., Millet, L., Galitzky, J., Lafontan, M., and Berlan, M. 1996. In situ assessment of the role of the beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue. *Br. J. Pharmacol.* **117**(5): 907-913.

- Baron, A.D., Tarshoby, M., Hook, G., Lazaridis, E. N., Cronin, J., Johnson, A., and Steinberg, H. O. 2000. Interaction between insulin sensitivity and muscle perfusion on glucose uptake in human skeletal muscle: evidence for capillary recruitment. *Diabetes* **49**(5): 768-774.
- Bartness, T.J. 2002. Dual innervation of white adipose tissue: some evidence for parasympathetic nervous system involvement. *J. Clin. Invest* **110**(9): 1235-1237.
- Belfiore, F., Iannello, S., and Volpicelli, G. 1998. Insulin sensitivity indices calculated from basal and OGTT-induced insulin, glucose, and FFA levels. *Mol. Genet. Metab* **63**(2): 134-141.
- Bertin, E., Arner, P., Bolinder, J., and Hagstrom-Toft, E. 2001. Action of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**(3): 1229-1234.
- Blaak, E.E., van Baak, M. A., Kemerink, G. J., Pakbiers, M. T., Heidendal, G. A., and Saris, W. H. 1995. Beta-adrenergic stimulation and abdominal subcutaneous fat blood flow in lean, obese, and reduced-obese subjects. *Metabolism* **44**(2): 183-187.
- Boschmann, M., Ringel, J., Klaus, S., and Sharma, A. M. 2001. Metabolic and hemodynamic response of adipose tissue to angiotensin II. *Obes. Res.* **9**(8): 486-491.
- Brassard, P., Frisch, F., Lavoie, F., Cyr, D., Bourbonnais, A., Cunnane, S. C., Patterson, B. W., Drouin, R., Baillargeon, J. P., and Carpentier, A. C. 2008. Impaired plasma nonesterified fatty acid tolerance is an early defect in the natural history of type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **93**(3): 837-844.

Bülow, J. 1981. Human adipose tissue blood flow during prolonged exercise, III. Effect of beta-adrenergic blockade, nicotinic acid and glucose infusion. *Scand. J. Clin. Lab Invest* **41**(4): 415-424.

Bülow, J., Astrup, A., Christensen, N. J., and Kastrup, J. 1987a. Blood flow in skin, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in the forearm of normal man during an oral glucose load. *Acta Physiol Scand.* **130**(4): 657-661.

Bülow, J., Jelnes, R., Astrup, A., Madsen, J., and Vilmann, P. 1987b. Tissue/blood partition coefficients for xenon in various adipose tissue depots in man. *Scand. J. Clin. Lab Invest* **47**(1): 1-3.

Caballero, A.E., Saouaf, R., Lim, S. C., Hamdy, O., Abou-Elenin, K., O'Connor, C., Logerfo, F. W., Horton, E. S., and Veves, A. 2003. The effects of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the endothelial function in early and late type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized clinical trial. *Metabolism* **52**(2): 173-180.

Caldiz, C.I. and de Cingolani, G. E. 1999. Insulin resistance in adipocytes from spontaneously hypertensive rats: effect of long-term treatment with enalapril and losartan. *Metabolism* **48**(8): 1041-1046.

Camarda, V., Rizzi, A., Calo, G., Gendron, G., Perron, S. I., Kostenis, E., Zamboni, P., Mascoli, F., and Regoli, D. 2002. Effects of human urotensin II in isolated vessels of various species; comparison with other vasoactive agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **365**(2): 141-149.

Carpentier, A.C. 2008. Postprandial fatty acid metabolism in the development of lipotoxicity and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* **34**(2): 97-107.

Carpentier, A.C., Frisch, F., Brassard, P., Lavoie, F., Bourbonnais, A., Cyr, D., Giguere, R., and Baillargeon, J. P. 2007. Mechanism of insulin-stimulated clearance of plasma nonesterified fatty acids in humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **292**(3): E693-E701.

Cooke, J.P. and Dzau, V. J. 1997. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu. Rev. Med* **48**:489-509.

Coppack, S.W., Evans, R. D., Fisher, R. M., Frayn, K. N., Gibbons, G. F., Humphreys, S. M., Kirk, M. L., Potts, J. L., and Hockaday, T. D. 1992. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism* **41**(3): 264-272.

Coppack, S.W., Fisher, R. M., Gibbons, G. F., Humphreys, S. M., McDonough, M. J., Potts, J. L., and Frayn, K. N. 1990a. Postprandial substrate deposition in human forearm and adipose tissues in vivo. *Clin. Sci. (Lond)* **79**(4): 339-348.

Coppack, S.W., Frayn, K. N., Humphreys, S. M., Whyte, P. L., and Hockaday, T. D. 1990b. Arteriovenous differences across human adipose and forearm tissues after overnight fast. *Metabolism* **39**(4): 384-390.

DeFronzo, R.A. 2004. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int. J. Clin. Pract. Suppl*(143): 9-21.

Dimitriadis, G., Lambadiari, V., Mitrou, P., Maratou, E., Boutati, E., Panagiotakos, D. B., Economopoulos, T., and Raptis, S. A. 2007. Impaired postprandial blood flow in adipose tissue may be an early marker of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **30**(12): 3128-3130.

Donovan, C.M., Cane, P., and Bergman, R. N. 1991. Search for the hypoglycemia receptor using the local irrigation approach. *Adv. Exp. Med Biol* **291**:185-196.

Elia, M. and Kurpad, A. 1993. What is the blood flow to resting human muscle? Clin. Sci. (Lond) **84**(5): 559-563.

Engeli, S., Negrel, R., and Sharma, A. M. 2000. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. Hypertension **35**(6): 1270-1277.

Engeli, S., Schling, P., Gorzelniak, K., Boschmann, M., Janke, J., Ailhaud, G., Teboul, M., Massiera, F., and Sharma, A. M. 2003. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? Int. J. Biochem. Cell Biol **35**(6): 807-825.

Engeli, S. and Sharma, A. M. 2000. Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. Horm. Metab Res. **32**(11-12): 485-499.

Evans, K., Clark, M. L., and Frayn, K. N. 1999. Effects of an oral and intravenous fat load on adipose tissue and forearm lipid metabolism. Am. J. Physiol **276**(2 Pt 1): E241-E248.

Fagius, J. and Karhuvaara, S. 1989. Sympathetic activity and blood pressure increases with bladder distension in humans. Hypertension **14**(5): 511-517.

Fernqvist, E. and Linde, B. 1988. Potent mental stress and insulin absorption in normal subjects. Diabetes Care **11**(8): 650-655.

Flechner-Mors, M., Jenkinson, C. P., Alt, A., Adler, G., and Ditschuneit, H. H. 2002. In vivo alpha(1)-adrenergic lipolytic activity in subcutaneous adipose tissue of obese subjects. J. Pharmacol. Exp. Ther. **301**(1): 229-233.

Frayn, K.N., Humphreys, S. M., and Coppack, S. W. 1995. Fuel selection in white adipose tissue. Proc. Nutr. Soc. **54**(1): 177-189.

Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B. A., Macdonald, I. A., and Coppack, S. W. 2003.

Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27**(8): 875-888.

Fredholm, B.B. and Sollevi, A. 1981. The release of adenosine and inosine from canine subcutaneous adipose tissue by nerve stimulation and noradrenaline. *J. Physiol* **313**351-367.

Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F. J., and Burrell, M. A. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **280**(6): E827-E847.

Galitzky, J., Lafontan, M., Nordenstrom, J., and Arner, P. 1993. Role of vascular alpha-2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *J. Clin. Invest* **91**(5): 1997-2003.

Gaudiot, N., Ribiere, C., Jaubert, A. M., and Giudicelli, Y. 2000. Endogenous nitric oxide is implicated in the regulation of lipolysis through antioxidant-related effect. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **279**(5): C1603-C1610.

Golpon, H.A., Puechner, A., Welte, T., Wichert, P. V., and Feddersen, C. O. 2001.

Vasorelaxant effect of glucagon-like peptide-(7-36)amide and amylin on the pulmonary circulation of the rat. *Regul. Pept.* **102**(2-3): 81-86.

Goossens, G.H., Blaak, E. E., and van Baak, M. A. 2003. Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obes. Rev.* **4**(1): 43-55.

- Green, B.D., Hand, K. V., Dougan, J. E., McDonnell, B. M., Cassidy, R. S., and Grieve, D. J. 2008. GLP-1 and related peptides cause concentration-dependent relaxation of rat aorta through a pathway involving KATP and cAMP. *Arch. Biochem. Biophys.* **478**(2): 136-142.
- Hagstrom-Toft, E., Bolinder, J., Ungerstedt, U., and Arner, P. 1997. A circadian rhythm in lipid mobilization which is altered in IDDM. *Diabetologia* **40**(9): 1070-1078.
- Hansson, L., Lindholm, L. H., Niskanen, L., Lanke, J., Hedner, T., Niklason, A., Luomanmaki, K., Dahlof, B., de Faire, U., Morlin, C., Karlberg, B. E., Wester, P. O., and Bjorck, J. E. 1999. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet* **353**(9153): 611-616.
- Harte, A., McTernan, P., Chetty, R., Coppack, S., Katz, J., Smith, S., and Kumar, S. 2005. Insulin-mediated upregulation of the renin angiotensin system in human subcutaneous adipocytes is reduced by rosiglitazone. *Circulation* **111**(15): 1954-1961.
- Hauner, H. and Hochberg, Z. 2002. Endocrinology of adipose tissue. *Horm. Metab Res.* **34**(11-12): 605-606.
- Hauner, H., Petruschke, T., and Gries, F. A. 1994. Endothelin-1 inhibits the adipose differentiation of cultured human adipocyte precursor cells. *Metabolism* **43**(2): 227-232.
- Hayden, M.R. and Tyagi, S. C. 2003. Myocardial redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and congestive heart failure. *Med Sci. Monit.* **9**(7): SR35-SR52.

- Hennington, B.S., Zhang, H., Miller, M. T., Granger, J. P., and Reckelhoff, J. F. 1998. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension* **31**(1 Pt 2): 283-288.
- Henriksen, E.J. 2002. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. *J. Appl. Physiol* **93**(2): 788-796.
- Hjemdahl, P., Linde, B., Daleskog, M., and Belfrage, E. 1983. Sympatho-adrenal regulation of adipose tissue blood flow in dog and man. *Gen. Pharmacol.* **14**(1): 175-177.
- Hodgetts, V., Coppack, S. W., Frayn, K. N., and Hockaday, T. D. 1991. Factors controlling fat mobilization from human subcutaneous adipose tissue during exercise. *J. Appl. Physiol* **71**(2): 445-451.
- Horowitz, J.F., Braudy, R. J., Martin, W. H., III, and Klein, S. 1999. Endurance exercise training does not alter lipolytic or adipose tissue blood flow sensitivity to epinephrine. *Am. J. Physiol* **277**(2 Pt 1): E325-E331.
- Houmard, J.A., Tanner, C. J., Slentz, C. A., Duscha, B. D., McCartney, J. S., and Kraus, W. E. 2004. Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. *J. Appl. Physiol* **96**(1): 101-106.
- Ignarro, L.J. 2002. Wei Lun Visiting Professorial Lecture: Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. *J. Card Surg.* **17**(4): 301-306.
- Jansson, P.A., Larsson, A., and Lonnroth, P. N. 1998. Relationship between blood pressure, metabolic variables and blood flow in obese subjects with or without non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest* **28**(10): 813-818.

Jansson, P.A., Larsson, A., Smith, U., and Lonnroth, P. 1992. Glycerol production in subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans. *J. Clin. Invest* **89**(5): 1610-1617.

Jensen, M.D. 2002. Adipose tissue and fatty acid metabolism in humans. *J. R. Soc. Med* **95 Suppl** 423-7.

Jialal, I., Crettaz, M., Hachiya, H. L., Kahn, C. R., Moses, A. C., Buzney, S. M., and King, G. L. 1985. Characterization of the receptors for insulin and the insulin-like growth factors on micro- and macrovascular tissues. *Endocrinology* **117**(3): 1222-1229.

Jordan, J., Tank, J., Stoffels, M., Franke, G., Christensen, N. J., Luft, F. C., and Boschmann, M. 2001. Interaction between beta-adrenergic receptor stimulation and nitric oxide release on tissue perfusion and metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**(6): 2803-2810.

Joyner, L.P. and Norton, C. C. 1976. The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*. *Parasitology* **72**(1): 115-125.

Karpe, F., Fielding, B. A., Ardilouze, J. L., Ilic, V., Macdonald, I. A., and Frayn, K. N. 2002a. Effects of insulin on adipose tissue blood flow in man. *J. Physiol* **540**(Pt 3): 1087-1093.

Karpe, F., Fielding, B. A., Ilic, V., Humphreys, S. M., and Frayn, K. N. 2002b. Monitoring adipose tissue blood flow in man: a comparison between the (133)xenon washout method and microdialysis. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **26**(1): 1-5.

Karpe, F., Fielding, B. A., Ilic, V., Macdonald, I. A., Summers, L. K., and Frayn, K. N. 2002c. Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. *Diabetes* **51**(8): 2467-2473.

Karpe, F., Olivecrona, T., Olivecrona, G., Samra, J. S., Summers, L. K., Humphreys, S. M., and Frayn, K. N. 1998. Lipoprotein lipase transport in plasma: role of muscle and adipose tissues in regulation of plasma lipoprotein lipase concentrations. *J. Lipid Res.* **39**(12): 2387-2393.

Kentsch, M. and Otter, W. 1999. Novel neurohormonal modulators in cardiovascular disorders. The therapeutic potential of endopeptidase inhibitors. *Drugs R. D.* **1**(4): 331-338.

Klein, S., Horowitz, J. F., Landt, M., Goodrick, S. J., Mohamed-Ali, V., and Coppack, S. W. 2000. Leptin production during early starvation in lean and obese women. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **278**(2): E280-E284.

Kreier, F., Fliers, E., Voshol, P. J., Van Eden, C. G., Havekes, L. M., Kalsbeek, A., Van Heijningen, C. L., Sluiter, A. A., Mettenleiter, T. C., Romijn, J. A., Sauerwein, H. P., and Buijs, R. M. 2002. Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J. Clin. Invest* **110**(9): 1243-1250.

Kreier, F., Yilmaz, A., Kalsbeek, A., Romijn, J. A., Sauerwein, H. P., Fliers, E., and Buijs, R. M. 2003. Hypothesis: shifting the equilibrium from activity to food leads to autonomic unbalance and the metabolic syndrome. *Diabetes* **52**(11): 2652-2656.

Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J., and King, G. L. 2000. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* **101**(6): 676-681.

Laakso, M., Edelman, S. V., Olefsky, J. M., Brechtel, G., Wallace, P., and Baron, A. D.

1990. Kinetics of in vivo muscle insulin-mediated glucose uptake in human obesity. *Diabetes* **39**(8): 965-974.

Laaksonen, D.E., Nuutinen, J., Lahtinen, T., Rissanen, A., and Niskanen, L. K. 2003.

Changes in abdominal subcutaneous fat water content with rapid weight loss and long-term weight maintenance in abdominally obese men and women. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **27**(6): 677-683.

Lafontan, M. and Arner, P. 1996. Application of in situ microdialysis to measure metabolic and vascular responses in adipose tissue. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**(9): 309-313.

Laine, H., Knuuti, M. J., Ruotsalainen, U., Utriainen, T., Oikonen, V., Raitakari, M.,

Luotolahti, M., Kirvela, O., Vicini, P., Cobelli, C., Nuutila, P., and Yki-Jarvinen, H. 1998.

Preserved relative dispersion but blunted stimulation of mean flow, absolute dispersion, and blood volume by insulin in skeletal muscle of patients with essential hypertension.

Circulation **97**(21): 2146-2153.

Lange, K.H., Lorentsen, J., Isaksson, F., Simonsen, L., Juul, A., Christensen, N. J., Kjaer,

M., and Bulow, J. 2002. Subcutaneous abdominal adipose tissue lipolysis during exercise

determined by arteriovenous measurements in older women. *J. Am. Geriatr. Soc.* **50**(2): 275-281.

Larsen, O.A., Lassen, N. A., and Quaade, F. 1966. Blood flow through human adipose tissue determined with radioactive xenon. *Acta Physiol Scand.* **66**(3): 337-345.

Lavoie, J.L. and Sigmund, C. D. 2003. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **144**(6): 2179-2183.

Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* **23**(2): 201-229.

Linz, W., Wohlfart, P., Scholkens, B. A., Malinski, T., and Wiemer, G. 1999. Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc. Res.* **43**(3): 549-561.

Lyon, C.J., Law, R. E., and Hsueh, W. A. 2003. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* **144**(6): 2195-2200.

Masaki, T. 2000. The endothelin family: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **35**(4 Suppl 2): S3-S5.

Masegosa, M.A., Diaz, Torrens J., Gomez Ruiz, F. T., Sanchez, Guzman A., Gomez, Caravaca J., and Donate, Perez F. 1992. [A spontaneous pseudoaneurysm of the superficial femoral artery. Apropos a case]. *Angiologia* **44**(3): 110-112.

Mather, K., Anderson, T. J., and Verma, S. 2001. Insulin action in the vasculature: physiology and pathophysiology. *J. Vasc Res.* **38**(5): 415-422.

Meier, J.J., Gallwitz, B., Schmidt, W. E., and Nauck, M. A. 2002. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur. J. Pharmacol.* **440**(2-3): 269-279.

Millet, L., Barbe, P., Lafontan, M., Berlan, M., and Galitzky, J. 1998. Catecholamine effects on lipolysis and blood flow in human abdominal and femoral adipose tissue. *J. Appl. Physiol* **85**(1): 181-188.

- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H., and Coppack, S. W. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **22**(12): 1145-1158.
- Oliver, F.J., de la, Rubia G., Feener, E. P., Lee, M. E., Loeken, M. R., Shiba, T., Quertermous, T., and King, G. L. 1991. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J. Biol Chem.* **266**(34): 23251-23256.
- Patel, J.N., Coppack, S. W., Goldstein, D. S., Miles, J. M., and Eisenhofer, G. 2002. Norepinephrine spillover from human adipose tissue before and after a 72-hour fast. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**(7): 3373-3377.
- Pedram, A., Razandi, M., and Levin, E. R. 2001. Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis. *Endocrinology* **142**(4): 1578-1586.
- Raitakari, M., Nuutila, P., Knuuti, J., Raitakari, O. T., Laine, H., Ruotsalainen, U., Kirvela, O., Takala, T. O., Iida, H., and Yki-Jarvinen, H. 1997. Effects of insulin on blood flow and volume in skeletal muscle of patients with IDDM: studies using [15O]H₂O, [15O]CO, and positron emission tomography. *Diabetes* **46**(12): 2017-2021.
- Rask, E., Olsson, T., Soderberg, S., Holst, J. J., Tura, A., Pacini, G., and Ahren, B. 2004. Insulin secretion and incretin hormones after oral glucose in non-obese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism* **53**(5): 624-631.
- Ribiere, C., Jaubert, A. M., Gaudiot, N., Sabourault, D., Marcus, M. L., Boucher, J. L., Denis-Henriot, D., and Giudicelli, Y. 1996. White adipose tissue nitric oxide synthase: a potential source for NO production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**(3): 706-712.

Romanski, S.A., Nelson, R. M., and Jensen, M. D. 2000. Meal fatty acid uptake in adipose tissue: gender effects in nonobese humans. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **279**(2): E455-E462.

Rosell, S., Axelrod, J., and Kopin, I. J. 1964. Release Of Tritiated Epinephrine Following Sympathetic Nerve Stimulation. *Nature* **201**301

Safonova, I., Aubert, J., Negrel, R., and Ailhaud, G. 1997. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochem. J.* **322 (Pt 1)**235-239.

Samra, J.S., Frayn, K. N., Giddings, J. A., Clark, M. L., and Macdonald, I. A. 1995. Modification and validation of a commercially available portable detector for measurement of adipose tissue blood flow. *Clin. Physiol* **15**(3): 241-248.

Samra, J.S., Simpson, E. J., Clark, M. L., Forster, C. D., Humphreys, S. M., Macdonald, I. A., and Frayn, K. N. 1996a. Effects of adrenaline infusion on the interstitial environment of subcutaneous adipose tissue as studied by microdialysis. *Clin. Sci. (Lond)* **91**(4): 425-430.

Samra, J.S., Simpson, E. J., Clark, M. L., Forster, C. D., Humphreys, S. M., Macdonald, I. A., and Frayn, K. N. 1996b. Effects of epinephrine infusion on adipose tissue: interactions between blood flow and lipid metabolism. *Am. J. Physiol* **271**(5 Pt 1): E834-E839.

Savage, D.B., Petersen, K. F., and Shulman, G. I. 2005. Mechanisms of insulin resistance in humans and possible links with inflammation. *Hypertension* **45**(5): 828-833.

Scherrer, U. and Sartori, C. 1997. Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation* **96**(11): 4104-4113.

Schiffrin, E.L. 2002. Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am. J. Med* **113**(5): 409-418.

Schling, P. and Loffler, G. 2001. Effects of angiotensin II on adipose conversion and expression of genes of the renin-angiotensin system in human preadipocytes. *Horm. Metab Res.* **33**(4): 189-195.

Shen, W., Wang, Z., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., Imielinska, C., Ross, R., and Heymsfield, S. B. 2003. Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes. Res.* **11**(1): 5-16.

Shih, K.C., Kwok, C. F., and Ho, L. T. 2000. Combined use of insulin and endothelin-1 causes decrease of protein expression of beta-subunit of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and insulin-stimulated glucose uptake in rat adipocytes. *J. Cell Biochem.* **78**(2): 231-240.

Sidhu, J.S., Cowan, D., and Kaski, J. C. 2004. Effects of rosiglitazone on endothelial function in men with coronary artery disease without diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* **94**(2): 151-156.

Siiteri, P.K. 1987. Adipose tissue as a source of hormones. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**(1 Suppl): 277-282.

Simonsen, L., Bulow, J., Astrup, A., Madsen, J., and Christensen, N. J. 1990. Diet-induced changes in subcutaneous adipose tissue blood flow in man: effect of beta-adrenoceptor inhibition. *Acta Physiol Scand.* **139**(2): 341-346.

- Sindrup, J.H., Kastrup, J., Jorgensen, B., Bulow, J., and Lassen, N. A. 1991. Nocturnal variations in subcutaneous blood flow rate in lower leg of normal human subjects. *Am. J. Physiol* **260**(2 Pt 2): H480-H485.
- Stallknecht, B., Larsen, J. J., Mikines, K. J., Simonsen, L., Bulow, J., and Galbo, H. 2000. Effect of training on insulin sensitivity of glucose uptake and lipolysis in human adipose tissue. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **279**(2): E376-E385.
- Stallknecht, B., Lorentsen, J., Enevoldsen, L. H., Bulow, J., Biering-Sorensen, F., Galbo, H., and Kjaer, M. 2001. Role of the sympathoadrenergic system in adipose tissue metabolism during exercise in humans. *J. Physiol* **536**(Pt 1): 283-294.
- Stallknecht, B., Simonsen, L., Bulow, J., Vinten, J., and Galbo, H. 1995. Effect of training on epinephrine-stimulated lipolysis determined by microdialysis in human adipose tissue. *Am. J. Physiol* **269**(6 Pt 1): E1059-E1066.
- Steinberg, H.O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N., and Baron, A. D. 1994. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J. Clin. Invest* **94**(3): 1172-1179.
- Steinberg, H.O., Tarshoby, M., Monestel, R., Hook, G., Cronin, J., Johnson, A., Bayazeed, B., and Baron, A. D. 1997. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *J. Clin. Invest* **100**(5): 1230-1239.
- Stich, V., de, Glisezinski, I, Berlan, M., Bulow, J., Galitzky, J., Harant, I., Suljkovicova, H., Lafontan, M., Riviere, D., and Crampes, F. 2000. Adipose tissue lipolysis is increased during a repeated bout of aerobic exercise. *J. Appl. Physiol* **88**(4): 1277-1283.

Stich, V., de, Glisezinski, I., Galitzky, J., Hejnova, J., Crampes, F., Riviere, D., and Berlan, M. 1999. Endurance training increases the beta-adrenergic lipolytic response in subcutaneous adipose tissue in obese subjects. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **23**(4): 374-381.

Stich, V., Pelikanova, T., Wohl, P., Sengenès, C., Zakaroff-Girard, A., Lafontan, M., and Berlan, M. 2003. Activation of alpha2-adrenergic receptors blunts epinephrine-induced lipolysis in subcutaneous adipose tissue during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in men. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **285**(3): E599-E607.

Summers, L.K., Callow, J., Samra, J. S., Macdonald, I. A., Matthews, D. R., and Frayn, K. N. 2001. The effect on adipose tissue blood flow of isoenergetic meals containing different amounts and types of fat. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **25**(9): 1294-1299.

Summers, L.K., Samra, J. S., and Frayn, K. N. 1999. Impaired postprandial tissue regulation of blood flow in insulin resistance: a determinant of cardiovascular risk? *Atherosclerosis* **147**(1): 11-15.

Summers, L.K., Samra, J. S., Humphreys, S. M., Morris, R. J., and Frayn, K. N. 1996. Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow: variation within and between subjects and relationship to obesity. *Clin. Sci. (Lond)* **91**(6): 679-683.

Tan, G.D., Fielding, B. A., Currie, J. M., Humphreys, S. M., Desage, M., Frayn, K. N., Laville, M., Vidal, H., and Karpe, F. 2005. The effects of rosiglitazone on fatty acid and triglyceride metabolism in type 2 diabetes. *Diabetologia* **48**(1): 83-95.

Towfighi, A. and Ovbiagele, B. 2008. Partial peroxisome proliferator-activated receptor agonist angiotensin receptor blockers. Potential multipronged strategy in stroke prevention. *Cerebrovasc. Dis.* **26**(2): 106-112.

Trayhurn, P. and Beattie, J. H. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* **60**(3): 329-339.

Tuck, M.L. and Corry, Dalila B. 2005. The metabolic effects of angiotensin-receptor blockers. *Current Hypertension Reports* **7**(2): 85-87.

Vehkavaara, S., Seppala-Lindroos, A., Westerbacka, J., Groop, P. H., and Yki-Jarvinen, H. 1999. In vivo endothelial dysfunction characterizes patients with impaired fasting glucose. *Diabetes Care* **22**(12): 2055-2060.

Vicent, D., Ilany, J., Kondo, T., Naruse, K., Fisher, S. J., Kisanuki, Y. Y., Bursell, S., Yanagisawa, M., King, G. L., and Kahn, C. R. 2003. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J. Clin. Invest* **111**(9): 1373-1380.

Virtanen, K.A., Lonroth, P., Parkkola, R., Peltoniemi, P., Asola, M., Viljanen, T., Tolvanen, T., Knuuti, J., Ronnema, T., Huupponen, R., and Nuutila, P. 2002. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **87**(8): 3902-3910.

Wahren, J., Ekberg, K., Johansson, J., Henriksson, M., Pramanik, A., Johansson, B. L., Rigler, R., and Jornvall, H. 2000. Role of C-peptide in human physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* **278**(5): E759-E768.

Wang, T.D., Chen, W. J., Lin, J. W., Chen, M. F., and Lee, Y. T. 2004. Effects of rosiglitazone on endothelial function, C-reactive protein, and components of the metabolic syndrome in nondiabetic patients with the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiol.* **93**(3): 362-365.

Yki-Järvinen, H. and Utriainen, T. 1998. Insulin-induced vasodilatation: physiology or pharmacology? *Diabetologia* **41**(4): 369-379.

Zorad, S., Fickova, M., Zelezna, B., Macho, L., and Kral, J. G. 1995. The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen. Physiol Biophys.* **14**(5): 383-391.

Article 2) A new technique for investigating the metabolism and pharmacology of subcutaneous adipose tissue

Avant-propos de l'article

L'article «A new technique for investigating the metabolism and pharmacology of subcutaneous adipose tissue» est écrit sous la forme d'un article scientifique de revue et vient d'être soumis au *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. Les co-auteurs sont Elizabeth Martin, Pascal Brassard, André C. Carpentier et Jean-Luc Ardilouze.

Résumé

Plusieurs techniques ont été développées pour la mesure du FSTA chez l'humain : la méthode de la mesure de la clairance du ^{133}Xe , considérée comme l'étalon or dans ce domaine, la microdialyse et d'autres méthodes plus dispendieuses et/ou non-validées. Ce manuscrit décrit la microinfusion du TA, une nouvelle méthode unique puisque qu'elle permet de mesurer de manière quantitative le FSTA localement au site d'investigation et de faire varier simultanément le flot sanguin en infusant de façon continue, des agents vasoactifs. Cette méthode permet la comparaison directe des effets d'agents pharmacologiques ou d'hormones sur le FSTA avec une mesure contrôle controlatéral. Elle est basée sur la technique de la clairance du ^{133}Xe . Le TA sous-cutané abdominal a été choisi comme site anatomique d'investigation. La microinfusion dans le TA améliore la précision et la faisabilité des études physiologiques et pharmacologiques du FSTA *in vivo* chez l'humain. D'ailleurs, elle a déjà permis l'identification de plusieurs acteurs impliqués dans la régulation du FSTA chez des sujets sains. Cette nouvelle méthode d'investigation permettra de déterminer les principes régissant la régulation du FSTA et par le fait même de mieux

comprendre le développement de la résistance à l'insuline, du diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires.

Contribution personnelle à cet article :

- Mise au point de la technique de microinfusion du TA à Sherbrooke.
- Rescension des écrits de la littérature.
- Rédaction de l'article.

Article**A NEW TECHNIQUE FOR INVESTIGATING THE METABOLISM AND PHARMACOLOGY OF SUBCUTANEOUS ADIPOSE TISSUE****Authors:**

Elizabeth Martin¹, Pascal Brassard¹, André C. Carpentier¹ and Jean-Luc Ardilouze^{1*}.

Institutions:

¹Diabetes and Metabolism Research Group, Division of Endocrinology, Department of Medicine, Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Québec, Canada

***Corresponding author:**

Jean-Luc Ardilouze, MD, PhD

Endocrine Division

Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke

3001 12th Ave N., Sherbrooke, Qc, J1H 5N4

Tel: 819-564-5241

Sources of support:

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and Diabète Québec.

Jean-Luc Ardilouze is a CIHR scholar (2006 CIHR New Investigator Award) and is a member of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-LeBel.

Number of words: 4301

ABSTRACT

According to the Flick's principle, any metabolic or hormonal exchange through a tissue depends on the product of blood flow and arteriovenous difference. Therefore, given the storage and endocrine roles of adipose tissue, the regulation of adipose tissue blood flow (ATBF) is of pivotal importance. Monitoring ATBF in humans can be achieved through different methodologies, such as the ^{133}Xe wash-out technique, considered the *gold standard*, microdialysis as well as other methods that are not well validated. This report describes a new method, called adipose tissue microinfusion (ATM), which combines simultaneous quantification of ATBF by the ^{133}Xe wash-out technique and induced variations of blood flow by local infusion of vasoactive agents. The most appropriate site for these investigations is the subcutaneous adipose tissue of the anterior abdominal wall. This innovative method allows direct comparison of the effects of any vasoactive compound, drug or hormone on ATBF, with a contralateral saline control side. The method improves the accuracy and feasibility of physiological and pharmacological studies on the regulation of ATBF *in vivo* in humans.

Words: 172

Key words: adipose tissue, blood flow, ^{133}Xe wash-out.

Abbreviations: ATBF, adipose tissue blood flow; ATM, adipose tissue microinfusion; SCAT, subcutaneous adipose tissue; TAG, triacylglycerol; FFA, free fat acid; LPL, lipoprotein lipase; T2DM, Type 2 Diabetes Mellitus.

INTRODUCTION: THE IMPORTANCE OF BLOOD FLOW IN ADIPOSE TISSUE

Adipose tissue is more than a passive repository for excess energy. Adipose tissue also expresses and secretes a considerable number of proteins and other molecules that are involved in multiple physiological or pathological processes (Frayn *et al.* 2003). These functions require the precise regulation of blood flow in adipose tissue (ATBF), with minute-by-minute control and rapid shifts in metabolic flux. The importance of ATBF regulation is highlighted by the following classic equation (Flick's principle): any metabolic or hormonal exchange (Ex) depends on the product of blood flow (BF) and arteriovenous difference (A-V):

$$\text{Ex} = \text{BF} \times (\text{A-V}) \text{ (Equation 1)}$$

In addition, variation in ATBF appears to be related to the tissue's metabolic activity. ATBF increases during fat mobilization, e.g. TAG clearance for fat deposition (postprandial period) (Samra *et al.* 1996) and release of FFA (fasting, post absorptive state, prolonged exercise) (Coppack *et al.* 1992). The physiological postprandial doubling of ATBF begins some 30 to 60 min following oral glucose load and lasts 2 to 2.5 hours (Bulow *et al.* 1987).

Impaired regulation of ATBF is linked to obesity and insulin resistance (Jansson *et al.* 1998; Summers *et al.* 1999; Karpe *et al.* 2002c). In obese and/or insulin-resistant individuals, fasting ATBF is lower than in healthy normal-weight subjects and the increase in postprandial ATBF is blunted e.g. ATBF enhancement peaks under 50% above baseline ATBF (Coppack *et al.* 1992; Blaak *et al.* 1995; Jansson *et al.* 1998; Karpe *et al.* 2002c). Fasting and the postprandial rise of ATBF negatively correlate with BMI (Summers *et al.* 1996) with the primary determinant of responsiveness not being obesity *per se* but rather the associated insulin resistance (Karpe *et al.* 2002c; Laaksonen *et al.* 2003). ATBF is blunted or

suppressed after meal ingestion at all stages leading up to type 2 diabetes (Dimitriadis *et al.* 2007). These lines of evidence suggest that impaired regulation of ATBF is another important facet of insulin resistance syndrome, therefore rendering ATBF physiology a highly relevant research topic.

MONITORING ATBF: METHODS

1. ¹³³Xenon wash-out

Blood flow measurement in tissue based on the clearance rate of a radioactive isotope injected directly into that tissue (wash-out technique) was introduced in the late 1940s (Kety 1948): the faster the disappearance of the isotope, the higher the blood flow through the tissue. This theory relies on the assumption that a diffusion coefficient equilibrium is maintained between fat-dissolved and blood isotope, i.e. that at all times during the study: $C = \lambda \times C_{\text{blood}}$, where C is the amount of isotope per g of fat tissue and C_{blood} is the amount of isotope per ml of blood (Larsen *et al.* 1966). The perfusion coefficient in the tissue region under study can be then calculated as the product of the exponential rate constant (k) per min (calculated from the semilog plot of disappearance of counts vs. time) and the tissue/blood λ of the tracer and applied as $F = k \times \lambda \times 100$, where F is the perfusion coefficient in ml \times 100 g of tissue⁻¹ \times min⁻¹ (Bulow 2001).

The inert and lipophilic nature of ¹³³Xe makes it ideal for studies in adipose tissue (Lassen *et al.* 1963; Larsen *et al.* 1966). ¹³³Xe has the advantage of considerable fat solubility and thus long retention in the tissue; it can be assumed to freely cross lipid-containing cellular membranes (Lassen 1964). Another lipophilic isotope is ^{99m}Tc (Linde and Hjemdahl 1982),

but because of its weak lipophilicity, it clears too rapidly from adipose tissue to conduct lengthy ATBF studies such as pre- and postprandial assessment of ATBF.

^{133}Xe is a γ -emitting isotope (half life = 5.2 days) produced by the fission of $^{235}\text{Uranium}$. After separation and purification, the ^{133}Xe radionuclide is supplied in gaseous form in vials with diluents such as CO_2 , air or carrier Xe gas (Saha 1998). ^{133}Xe is quantitatively exhaled during passage through the lungs, and therefore recirculation is not an issue. It is routinely used for lung scans (Campbell *et al.* 1992). For ATBF experiments, ^{133}Xe is usually injected into the tissue in a small volume of gas, although dilution into isotonic saline is also possible. However, due to the limited use of the saline preparation, its production has been discontinued, and ^{133}Xe is currently only available in gaseous form. Both two tissue labeling modes for ATBF measurement yield identical wash-out rates of ^{133}Xe (Simonsen *et al.* 2003). Equilibrium diffusion space after injection can be calculated using the equation: $r = 2\sqrt{D_{\text{Xe}} \times t}$ (Jelnes *et al.* 1985), where r is the radius of the sphere in which equilibrium takes place and D_{Xe} denotes the constant of diffusion for Xe ($D_{\text{Xe}} : 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$). After a 45 to 60 min equilibration period, the deposit of ^{133}Xe is extended over a volume of about 1 cm^3 (Larsen *et al.* 1966).

2. Microdialysis and Ethanol Outflow/Inflow Ratio

This technique is based on the principle that when a substance which is not metabolized locally in the tissue and does not affect local BF, is added to the microdialysis perfusate, the rate of diffusion out of the probe will depend on the concentration gradient between the perfusate and the interstitial space. It is assumed that the turnover of interstitial fluid is directly proportional to tissue blood flow. This allows for repeated sampling of interstitial

fluid of adipose tissue and infusion of effector molecules into the tissue without influencing whole body function (Lafontan and Arner 1996). Microdialysis has been widely used to investigate lipolysis (Arner *et al.* 1990; Bolinder *et al.* 2000) as well as lactate (Hagstrom *et al.* 1990) and adenosine metabolism (Lonnroth *et al.* 1989) in human adipose tissue.

Indirect estimation of local ATBF can be performed using microdialysis with the ethanol escape method, originally established for muscle (Hickner *et al.* 1992) and adapted for adipose tissue (Galitzky *et al.* 1993). The technique only provides an estimation of the difference in ATBF, and is therefore an indirect and non-quantitative method. In studies comparing the ethanol escape method with the ^{133}Xe wash-out technique (Karpe *et al.* 2002b), the decrease in ethanol ratio was delayed (approximately 40 min) in comparison with the increase in ATBF elicited by the ingestion of glucose. In addition, while ATBF recorded by ^{133}Xe showed a sharp decline following an initial sharp postprandial increase, the ethanol ratio showed no tendency toward a return to baseline. This latter method is therefore either not sufficiently sensitive, or sufficiently rapid, to respond to the subsequent decrease in ATBF.

3. Laser Doppler

Laser-doppler fluximetry utilizes monochromatic laser light to measure red cell flux within blood vessels into adipose tissue (Kastrup *et al.* 1987). Few publications have reported considerable spatial and temporal heterogeneity from subject to subject in both animals (Clark *et al.* 2001) and humans (Klassen *et al.* 1996). Initially described as a promising and alternatively non-invasive technique for studying subcutaneous adipose tissue (SCAT) using a thin optical fibre (Crandall *et al.* 1997), the feasibility of this technique in humans remains to be demonstrated.

4. Positron Emission Tomography (PET)

This method implies intravenous injection of freely diffusible [^{15}O]-labelled water and scanning of a defined adipose tissue volume (Virtanen *et al.* 2001). The PET technique allows direct regional assessment of perfusion without invasive catheterization or interference from other tissues. Reported ATBF values appear to be comparable to the ^{133}Xe wash-out technique.

A major advantage of blood flow determination with PET is the ability to simultaneously assess blood flow in several tissues. Both subcutaneous and visceral abdominal blood flow were shown to be lower in obese versus non-obese subjects during a euglycemic hyperinsulinemic clamp (Virtanen *et al.* 2001) although visceral blood flow was not different from the subcutaneous depot (Virtanen *et al.* 2002). Myocardial and muscle blood flow can also be assessed using compartmental modeling of tissue [^{11}C]-acetate or [^{13}N]-ammonia kinetics with PET (Kotzerke *et al.* 2001; van den Hoff *et al.* 2001). Using sequential PET tracer techniques, it is also possible to simultaneously monitor adipose tissue glucose uptake (Jelnes *et al.* 1985). In addition, time resolution of this technique is very high, allowing its use in non-steady states (e.g. postprandial state). The disadvantages of this method include its high costs and the requirement of on-site facilities and expertise for producing [^{15}O] H_2O . It also requires sequential or simultaneous MRI or CT for precise definition of regions of interest. Moreover, radiation exposure limits the use of this technique for repeated measurements within the same individual.

5. Need for a new method to explore ATBF regulation

The ^{133}Xe (^{133}Xe) wash-out technique is advantageous over other methods because it is reliable, safe, less costly and is considered the *gold standard* for monitoring ATBF (Enoksson *et al.* 1995). It has been used under pre- and post-prandial as well as in exercise conditions to assess the effect of systemic delivery (orally or parentally) of vasoactive compounds (hormones or pharmacological agents) on ATBF (Bulow 1981; Simonsen *et al.* 1990; Stallknecht *et al.* 2001).

However, this implies whole-body exposure to vasoactive agents. Pharmacological interventions may induce unwarranted well-known side effects such as hypoglycemia (with insulin), bradycardia and low blood pressure (BP) (with α - and β -blockers), high BP (with N^G -monomethyl-L-arginine, L-NMMA) and bronchospasm (with β -blockers). In addition, such side effects may interfere with the interpretation of results, as hypoglycemia normally inhibits endogenous insulin secretion and any change in BP will induce sympathetic- and parasympathetic-mediated inverse reactions. Moreover, more than one experimental day is needed for each subject, e.g. one day for assessment of the vasoactive agent, and a second day for placebo control.

As outlined above, because other techniques for monitoring changes in ATBF are either less discriminative, as of yet not fully validated, or expensive to set-up, a new method or a combination of techniques was needed to meet ATBF research criteria. The specifications of such a method should ideally avoid systemic delivery of drugs, allow for pharmacological as well as physiological studies without interference from systemic circulation, allow same

subject control sites, be well tolerated and safe, be reliable and reproducible, be user friendly in patients, and finally not be overly expensive.

THE NEW ATM TECHNIQUE (Figure 1)

A novel technique, termed “adipose tissue microinfusion (ATM)”, was recently developed by one (JLA) of us (Karpe F *et al.* 2002a). This method offers the unique possibility of quantitatively monitoring local ATBF *in vivo* in humans using the ^{133}Xe wash-out technique and simultaneously altering local ATBF by the local administration of vasoactive agents infused directly into the exact location where ^{133}Xe has been deposited.

1. Syringes and catheters. Syringes (BD-Canada, Oakville, ON, Canada, 1 ml, 25G5/8) filled with saline are installed into a precision pump (CMA100 pump, Chromatography Sciences Company, St-

Laurent, Canada). A catheter (Quick-set infusion set, Minimed, Medtronic of Canada Ltd, Mississauga, Canada) is connected to each syringe. This infusion set is comprised of a straight 100-cm long teflon catheter with detachable tubing from the head (or connector) at the

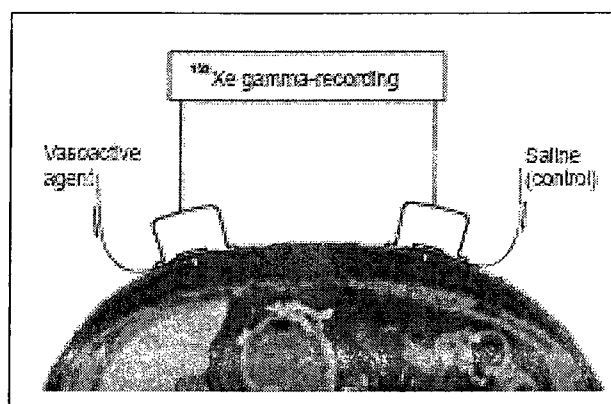


Figure 1. ATM. The method is based on ^{133}Xe wash-out and allows for simultaneous monitoring and manipulation of local adipose tissue blood flow with vasoactive agents and homolateral control. A CT-scanner view of the anterior abdominal wall is represented. Detectors of ^{133}Xe gamma-recording are placed over the abdomen, above the connector part of the catheters and the cannulas insert in the subcutaneous adipose tissue where ^{133}Xe has been injected (through the cannula).

infusion site. Disconnection of the tubing line from the connector is simple and easily performed. The head is incorporated into an adhesive pad and contains a cannula (25G x 9 or 6 mm long) with an internal diameter of 0.38 mm and outer diameter of 1.5 mm, and a 60 μl

chamber. The total priming volume of the system is 150 μ l. After their respective connection to each syringe, the catheters are flushed until the first drop of the infusion is seen at the end of the cannula. Thereafter, the pump is set at 2 μ l/min. and catheters are inserted into the abdominal SCAT after careful evaluation so as to avoid puncture or traumatism to any tiny subcutaneous vein of the underlying vasculature in the chosen anterior abdominal area. It may be advisable to visualize the vascularization of the underlying tissue by using either a red cold light source or ultrasound. Insertion of the cannula of the two (or four) catheters containing saline into the abdominal SCAT is made 8 to 10 cm on either side of the midline of the abdomen (Ardilouze *et al.* 2004a), with two sets installed 8 cm above the umbilicus and two sets 6 to 8 cm below. The insertion needle is removed and the adhesive hub of the catheter is carefully kept in place until removal, at the end of the experiment.

2. ^{133}Xe (Bristol-Myers Squibb Canada Co., St-Laurent, Canada) is retrieved from the storage vial using a fine needle syringe (BD ultra-fine 29G 12,7 mm) and injected through the hub of the connector described above. The volume of ^{133}Xe injected is dependent of the amount of radioactivity required, usually 0.5 to 1 MBq, and is calculated according to the specific activity on the day of manufacturing. ^{133}Xe is injected at least 20 minutes after insertion of the catheters in SCAT; 20 min is the average time needed for the tissue to recover. Duration of injection of ^{133}Xe is 1 minute with the pump injection speed set at 60 μ l/min.

3. Detectors and tape. After injection of ^{133}Xe , probes (γ -counter probe CsI(Tl) scintillator detector, John Caunt Scientific Ltd, Oxford, UK) are taped firmly over the head of the catheter, e.g. over the ^{133}Xe -labelled adipose tissue. The base of each probe must be cut out in order to fit exactly over the head of the catheters. Insufficient taping will cause movement

artifacts that hamper accurate data collection. The respective detectors are placed 30 mm over each site of infusion in order to reduce statistical variation according to detector geometry with respect to the inverse square law ($1/r^2$). The patient is placed in supine position and must remain as motionless as possible throughout the experiment, so that only smooth respiratory movements of the abdominal wall can affect the geometry and only physiological and/or pharmacological stimulation have influence on ATBF variation monitoring.

Following ^{133}Xe injection, the cannulas are perfused for an additional 60 min at 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ to allow equilibration e.g. disappearance of hyperemia and diffusion/equilibration of ^{133}Xe into the tissue.

4. ATBF measurement and calculation. Radioactivity disappearance is monitored by collecting continuous 20 seconds (s). readings from the γ -counter probe. The curve of the decline of radioactivity is followed onscreen and the decision to initiate baseline experiment recording is taken 15 min after stable decay, upon observation of an approximately mono-exponential curve.

ATBF is usually calculated from the semilog plot of disappearance of radioactive counts versus time in 20 s intervals. For the calculation of quantitative values of ATBF (per 100g of tissue), the partition coefficient of ^{133}Xe between tissue and blood (λ) is assumed to be 10 ml/g (Yeh and Peterson 1965). ATBF can be calculated as follows: $\text{ATBF (ml} \times 100\text{g tissue}^{-1} \times \text{min}^{-1}) = \text{slope of semilog plot (in counts/sec)} \times \lambda \text{ (ml/g)} \times 100 \text{ (g)} \times 60 \text{ (s)}$ (Larsen *et al.* 1966).

5. ATM experimental design. Experiments usually begin at 7.00-8.00 AM after an overnight fast. Dissolution of vasoactive agents, as necessary, and dilution at optimal concentrations are prepared beforehand under sterile conditions. Usual concentrations vary between 10^{-8} and 10^{-4} mM, delivered at an infusion rate of 2 μ l/min, resulting in very nominal amounts of infused agents. Ideally, syringes containing saline or vasoactive agents are installed in two microinfusion pump(s). Syringes containing vasoactive agents are connected to catheters at the outset to ensure that each *complete* infusion set contains the vasoactive agent prior to connection to the hub of the catheter and to prevent any delay in action.

During the first portion of the experiment, saline-containing infusion sets are connected to the hub. Following the above-mentioned equilibration period, while saline is being infused, baseline fasting ATBF is recorded for a period of 30 min. Thereafter, at the randomly chosen sites, saline catheter(s) are switched to those containing vasoactive compounds by disconnection-reconnection at each hub of the infusion set, while maintaining the infusion rate at 2 μ l/min.

Thereafter, ATBF is recorded over various time intervals, depending on the objective of the experiment: e.g. to show the effect of different concentrations vs. the effect of various vasoactive agents (see below). In any event, the recording of blood flow will assess the effect of treatment *per se* while the saline (control) infusion is continued on the contralateral site to examine whether there is any change in ATBF during the experiment that is not attributable to infusion of pharmacological agent. ATBF regulation can be tested before and during specific conditions such as before, during and after physical exercise or pre- and

postprandially. In the latter instance, 75g oral glucose in 200 mL of water is usually the most tested physiological condition (Ardilouze *et al.* 2004a).

DISCUSSION

ATM is able to quantify local ATBF (at two or four sites, depending on the number of detectors available), with at least one site perfused with saline as an intrinsic control for direct comparison, and for example, before and after a meal (Ardilouze *et al.* 2004b). Furthermore, with four detectors, it is then possible to assess two vasoactive compounds or two concentrations of the same drug, in the same subject at the same time. Conversely, the effect on ATBF of two or three consecutive concentrations of any compound administered for 30-40 min. can be compared to saline. Such procedures are relatively easy to follow although every detail counts.

ATM has a purely local effect, allowing dissection of central vs. local peripheral effects, as demonstrated by 1) the absence of clinical or systemic biochemical changes induced during the experiments, 2) by the minute amount of drug delivered during each experiment and 3) the absence of effect of the drug at the contralateral control site (Ardilouze *et al.* 2004a).

However, in contrast to the microdialysis technique, direct sampling from adipose tissue, such as for metabolites, is not possible using ATM. The two techniques could therefore be seen as complementary. ATM could improve the interpretation of metabolite variations recorded by microdialysis by providing accurate blood flow in the area.

Despite the many advantages of ATM, some concerns need to be addressed.

1. Inter-individual variability. Inter-individual difference is a typical feature in human experiments. In a group of 38 subjects (median BMI=24 kg/m², with a range of 19-53), a basal ATBF inter-individual variation ranging from 0.56 to 10.41 ml x 100 g tissue⁻¹ x min⁻¹ was reported (Summers *et al.* 1996). Given the rather large BMI range, this variation is not surprising (Karpe *et al.* 2002c) although there was no statistical difference between two measurements taken the same day in the same subject. Despite the inter-individual variability in measurements, the microinfusion technique has the advantage of monitoring both sides of the abdomen, each subject acting as its own control.

2. Qualitative data. Under ATM conditions, it is not possible to delineate the exact 'sphere of influence' of the target molecule in comparison with ¹³³Xe. The infused substance has to be distributed in a volume of the same size as the radioisotope, which requires a very high diffusion coefficient. On the one hand, large molecules diffuse more slowly through the extracellular space, since molecular radius is inversely proportional to diffusivity (Stokes-Einstein's diffusivity equation). On the other hand, lipophilic molecules, such as Xe, are absorbed by adipocytes more quickly than hydrophilic molecules. Clearly, the technique can only yield qualitative estimates of function.

3. The coefficient of partition of ¹³³Xe, λ . The partition coefficient λ can be seen as an issue. The λ of ¹³³Xe has been estimated using skinfold thickness (Jansson and Lonnroth 1995), the double isotope technique (Jelnes *et al.* 1985) and other indirect calculations (Bulow *et al.* 1987; Blaak *et al.* 1995). Although demanding and not of routine use in clinical research, perhaps the best method is based on biochemical analysis of adipose tissue biopsies using the Ostwald solubility coefficient of ¹³³Xe in protein, water, lipid, red blood cells and plasma. In a cohort of lean subjects, the average λ calculated for ¹³³Xe was 8.2±1.2 ml.g⁻¹ in

the SCAT of the abdomen and the thigh. The value of λ varies with BMI. The coefficient was higher in obese subjects compared to lean subjects, 9.9 ml.g^{-1} vs. 8.6 ml.g^{-1} , when estimated from abdominal fat cell size (needle biopsies from SCAT) (Jansson and Lonnroth 1995). The composition of the environment also has an incidence on λ . When water content is increased by 20%, λ is reduced by 24% (Jelnes *et al.* 1985). This is a potential factor for the preferential use of gas instead of ^{133}Xe dissolved in isotonic saline.

In clinical research practice, a λ average value of 10 ml/g is used for calculation of ATBF, even when comparing adipose tissue depots (Enevoldsen *et al.* 2001) due to the difficulty in determining λ *in vivo* in humans as well as some uncertainty over whether λ for ^{133}Xe affects relative changes in blood flow during an experiment. On a particular day, it can be reasonably assumed that λ will remain constant. However, this rule may affect comparison between different groups of subjects (e.g. normal weight vs. obese subjects).

4. Radioactivity concern. In order to estimate the dose received, a calibrator (Capintec Inc, Ramsey, NJ, USA) is used for measuring syringe radioactivity immediately before and after injection. Generally, a dose of 0.5 to 1 MBq of gaseous ^{133}Xe is injected at each site. With ATM, four-site experiments can be performed simultaneously with a total amount of radioactivity under 4 MBq. A local depot of 5.7 MBq activity of ^{133}Xe corresponds to an effective absorbed dose of $1 \text{ } \mu\text{Sv}$ (Sievert unit) (Bulow 2001). As a measure of comparison, a single chest X-ray is approximately 0.02 mSv , e.g. $20 \text{ } \mu\text{Sv}$. The effective absorbed dose accepted per year for a Canadian resident not working in the nuclear domain is 1 mSv in accordance with the Canadian Nuclear Safety Commission. For a subject participating in an ATM study, the effective absorbed dose hence represents less than $0.7 \text{ } \mu\text{Sv}$, or 0.07% of the total yearly recommended dose.

5. Volume concern. Since some subjects may feel pain or discomfort at the injection site after administration of important volumes, it is recommended that the volume of injected ^{133}Xe gas not exceed 100 μl . Moreover, in addition to being painful, larger volumes may give rise to initial problems with either very low or no wash-out caused by the compression of microcirculation, resulting in the depot not being washed-out for an undefined period of time (Bulow 2001).

6. Site of exploration. The SCAT of the anterior abdominal wall is the preferred anatomical site of investigation because it is easily accessible in contrast to visceral adipose tissue, and also because it is metabolically active, in contrast to gluteal and thigh adipose tissue (Tan *et al.* 2004). However, a fascia divides the SCAT into two layers. One concern may reside in the exact site where ATM is performed, e.g. in the superficial or deep layer. The superficial layer in each individual at the antero-lateral part of the abdominal wall is relatively constant in normal-weight subjects and accounts for 60% of thickness, e.g. 12 ± 6 mm (Johnson *et al.* 1996) to 14.8 ± 4.2 mm (Tafeit *et al.* 2000), depending upon BMI and the method of measurement used. The length of the cannula used for ATM is 6 mm; consequently it can be assumed that the end of the cannula, where ^{133}Xe is injected, is 6 mm beneath the surface of the skin, with 15 to 80 μl of ^{133}Xe distributed in a tissue volume of approximately 1 cm^3 .

Both right and left sides of the abdomen, at the same level, are studied simultaneously in each subject to allow direct comparison of the effects of the vasoactive compounds on one site with that of the contralateral control site. We have shown no observable difference in ATBF, in healthy subjects, between left and right sides at either level, although ATBF is

higher in the upper than in the lower areas of the abdominal anterior wall (Ardilouze *et al.* 2004b).

CONTRIBUTION OF ATM: PHARMACOLOGICAL EXPLORATION OF ATBF REGULATION

Since the ATM method was set up, our understanding of ATBF regulation has improved. In contrast to muscle, it has been shown that insulin has no direct vasodilatory effect on ATBF, either pre- or postprandially, or at physiological or elevated pharmacological concentrations (Karpe *et al.* 2002a). It has also been demonstrated that the postprandial increase in ATBF is related to activation of the sympathetic nervous system (SNS) and that NO determines the absolute level of fasting ATBF whereas a major proportion of postprandial enhancement of ATBF is under β -adrenergic regulation. By contrast, α -adrenoceptor stimulation induces mild vasoconstriction during fasting and does not appear to have an effect on postprandial ATBF enhancement. More importantly, SNS has been shown to have a direct local effect on adipose tissue, following a non-humoral pathway (Ardilouze *et al.* 2004a). It is estimated that only 50-60% of postprandial ATBF control is dependent upon SNS activation (Ardilouze *et al.* 2004a). Therefore, other regulatory factors (potentially incretins) are involved in this process. The role of the renin-angiotensin system on ATBF has also been investigated. Ang II induces tonic vasoconstriction in AT *via* interaction with the Ang II type 1 receptor although it has no major effect on the postprandial enhancement of ATBF. Circulating, but not locally produced Ang II regulates fasting ATBF, with the major proportion of Ang II-induced vasoconstriction being NO independent (Goossens *et al.* 2006).

CONCLUSION

The ATM technique is unique in the sense that it allows for direct quantification of ATBF and the simultaneous investigation of potential regulatory agents. ATM has a defined local effect, enabling the dissection of central vs. local peripheral regulation of ATBF. The use of very finite amounts of vasoactive agents together with the absence of drug effect at the contralateral control site are important and advantageous features of the technique. Since failure to regulate ATBF in the postprandial period seems to be a distinct feature of insulin resistance and obesity, this new labelling technique may help to demystify the principles governing the regulation of ATBF and by the same token, improve our understanding of the development of insulin resistance, T2DM and cardiometabolic diseases.

REFERENCES

Ardilouze, J.L. 2004. Regulation of adipose tissue blood flow in humans. PhD thesis.

University of Oxford: 1-251.

Ardilouze, J.L., Fielding, B.A., Currie, J.M., Frayn, K.N., and Karpe, F. 2004a. Nitric oxide and beta-adrenergic stimulation are major regulators of preprandial and postprandial subcutaneous adipose tissue blood flow in humans.[see comment]. *Circulation* **109**(1): 47-52.

Ardilouze, J.L., Karpe, F., Currie, J.M., Frayn, K.N., and Fielding, B.A. 2004b.

Subcutaneous adipose tissue blood flow varies between superior and inferior levels of the anterior abdominal wall. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **28**(2): 228-233.

Arner, P., Kriegholm, E., Engfeldt, P., and Bolinder, J. 1990. Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J. Clin. Invest.* **85**(3): 893-898.

Blaak, E.E., van Baak, M.A., Kemerink, G.J., Pakbiers, M.T., Heidendal, G.A., and Saris, W.H. 1995. Beta-adrenergic stimulation and abdominal subcutaneous fat blood flow in lean, obese, and reduced-obese subjects. *Metab. Clin. Exp.* **44**(2): 183-187.

Bolinder, J., Kerckhoffs, D.A., Moberg, E., Hagstrom-Toft, E., and Arner, P. 2000. Rates of skeletal muscle and adipose tissue glycerol release in nonobese and obese subjects. *Diabetes* **49**(5): 797-802.

Bulow, J. 2001. Measurement of adipose tissue blood flow. *Meth. Mol. Biol.* **155**: 281-293.

Bulow, J. 1981. Human adipose tissue blood flow during prolonged exercise, III. Effect of beta-adrenergic blockade, nicotinic acid and glucose infusion. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **41**(4): 415-424.

Bulow, J., Jelnes, R., Astrup, A., Madsen, J., and Vilmann, P. 1987. Tissue/blood partition coefficients for xenon in various adipose tissue depots in man. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **47**(1): 1-3.

Campbell, P.J., Carlson, M.G., Hill, J.O., and Nurjhan, N. 1992. Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification. *Am. J. Physiol.* **263**(6 Pt 1): E1063-E1069.

Canadian Nuclear Safety Commission. <http://www.nuclearsafety.gc.ca>

Chen, R.Y., Fan, F.C., Kim, S., Jan, K.M., Usami, S., and Chien, S. 1980. Tissue-blood partition coefficient for xenon: temperature and hematocrit dependence. *J. Appl. Physiol.* **49**(2): 178-183.

Clark, A.D., Youd, J.M., Rattigan, S., Barrett, E.J., and Clark, M.G. 2001. Heterogeneity of laser Doppler flowmetry in perfused muscle indicative of nutritive and nonnutritive flow. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* **280**(3): H1324-H1333.

Coppack, S.W., Evans, R.D., Fisher, R.M., Frayn, K.N., Gibbons, G.F., Humphreys, S.M., Kirk, M.L., Potts, J.L., and Hockaday, T.D. 1992. Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism: Metab. Clin. Exp.* **41**(3): 264-272.

Crandall, D.L., Hausman, G.J., and Kral, J.G. 1997. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* **4**(2): 211-232.

Dimitriadis, G., Lambadiari, V., Mitrou, P., Maratou, E., Boutati, E., Panagiotakos, D.B., Economopoulos, T., and Raptis, S.A. 2007. Impaired postprandial blood flow in the adipose

tissue may be an early marker of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **30**: 3128-3130.

Enevoldsen, L.H., Simonsen, L., Stallknecht, B., Galbo, H., and Bulow, J. 2001. In vivo human lipolytic activity in preperitoneal and subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**(5): E1110-E1114.

Enoksson, S., Nordenstrom, J., Bolinder, J., and Arner, P. 1995. Influence of local blood flow on glycerol levels in human adipose tissue. *Int. J. Obes.* **19**(5): 350-354.

Frayn, K.N., Ardilouze, J.L., Fielding, B.A., and Karpe, F. 2004. Coupling of metabolism and cardiovascular responses. *Clin. Sci. (Colch)* **106**(5): 547-548.

Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A., and Coppack, S.W. 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes.* **27**(8): 875-888.

Galitzky, J., Lafontan, M., Nordenstrom, J., and Arner, P. 1993. Role of vascular alpha-2 adrenoceptors in regulating lipid mobilization from human adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **91**(5): 1997-2003.

Goossens, G.H., McQuaid, S.E., Dennis, A.L., van Baak, M.A., Blaak, E.E., Frayn, K.N., Saris, W.H., and Karpe, F. 2006. Angiotensin II: a major regulator of subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. *J. Physiol. (Lond.)* **571**(Pt 2): 451-460.

Hagstrom, E., Arner, P., Ungerstedt, U., and Bolinder, J. 1990. Subcutaneous adipose tissue: a source of lactate production after glucose ingestion in humans. *Am. J. Physiol.* **258**(5 Pt 1): E888-E893.

Hickner, R.C., Rosdahl, H., Borg, I., Ungerstedt, U., Jorfeldt, L., and Henriksson, J. 1992.

The ethanol technique of monitoring local blood flow changes in rat skeletal muscle: implications for microdialysis. *Acta Physiol. Scand.* **146**(1): 87-97.

Jansson, P.A., Larsson, A., and Lonnroth, P.N. 1998. Relationship between blood pressure, metabolic variables and blood flow in obese subjects with or without non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* **28**(10): 813-818.

Jansson, P.A. and Lonnroth, P. 1995. Comparison of two methods to assess the tissue/blood partition coefficient for xenon in subcutaneous adipose tissue in man. *Clin. Physiol.* **15**(1): 47-55.

Jelnes, R., Astrup, A., and Bulow, J. 1985. The double isotope technique for in vivo determination of the tissue-to-blood partition coefficient for xenon in human subcutaneous adipose tissue--an evaluation. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **45**(6): 565-568.

Johnson, D., Cormack, G.C., Abrahams, P.H., and Dixon, A.K. 1996. Computed tomographic observations on subcutaneous fat: implications for liposuction. *Plast. Reconstr. Surg.* **97**(2): 387-396.

Kaplan, N.M. 1992. Effects of antihypertensive therapy on insulin resistance. *Hypertension* **19**(1 Suppl): 116-118.

Karpe, F., Fielding, B.A., Ardilouze, J.L., Ilic, V., Macdonald, I.A., and Frayn, K.N. 2002a. Effects of insulin on adipose tissue blood flow in man. *J. Physiol. (Lond.)* **540**(Pt 3): 1087-1093.

Karpe, F., Fielding, B.A., Ilic, V., Humphreys, S.M., and Frayn, K.N. 2002b. Monitoring adipose tissue blood flow in man: a comparison between the (133)xenon washout method and microdialysis. *Int. J. Obes.* **26**(1): 1-5.

Karpe, F., Fielding, B.A., Ilic, V., Macdonald, I.A., Summers, L.K., and Frayn, K.N. 2002c. Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. *Diabetes* **51**(8): 2467-2473.

Kastrup, J., Bulow, J., and Lassen, N.A. 1987. A comparison between 133Xenon washout technique and Laser Doppler flowmetry in the measurement of local vasoconstrictor effects on the microcirculation in subcutaneous tissue and skin. *Clin. Physiol.* **7**(5): 403-409.

Kety, S.S. 1948. Quantitative measurement of regional circulation by the clearance of radioactive sodium. *American Journal of medical Science* : 215(3):252.

Klassen, G.A., Janigan, D., Paton, B., Mathews, J., Perey, B., Macdonald, A.S., and Barclay, K.D. 1996. Body position, age and mass effect of adiposity on adipose tissue red cell flux in morbid obesity. *Obes. Res.* **4**(2): 145-151.

Kotzerke, J., Glatting, G., van den Hoff, J., Hoher, M., Neumaier, B., Wohrle, J., and Reske, S.N. 2001. Validation of myocardial blood flow estimation with nitrogen-13 ammonia PET by the argon inert gas technique in humans. *Eur. J. Nucl. Med.* **28**(3): 340-345.

Laaksonen, D.E., Nuutinen, J., Lahtinen, T., Rissanen, A., and Niskanen, L.K. 2003. Changes in abdominal subcutaneous fat water content with rapid weight loss and long-term weight maintenance in abdominally obese men and women. *Int. J. Obes.* **27**(6): 677-683.

Lafontan, M. and Arner, P. 1996. Application of in situ microdialysis to measure metabolic and vascular responses in adipose tissue. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**(9): 309-313.

Larsen, O.A., Lassen, N.A., and Quaade, F. 1966. Blood flow through human adipose tissue determined with radioactive xenon. *Acta Physiol. Scand.* **66**(3): 337-345.

Lassen, N.A. 1964. Muscle blood flow in normal man and in patients with intermittent claudication evaluated by simultaneous Xe133 and Na24 clearances. *J. Clin. Invest.* **43**: 1805-1812.

Lassen, N.A., Hoedt-Rasmussen, K., Lindbjerg, I., Pedersen, F., and Munck, O. 1963. Muscle blood flow determined by use of xenon 133. *Scand J Clin Lab Invest* **15**(Suppl 76):61.

Linde, B. and Hjemdahl, P. 1982. Effect of tilting on adipose tissue vascular resistance and sympathetic activity in humans. *Am. J. Physiol.* **242**(2): H161-167.

Lonnroth, P., Jansson, P.A., Fredholm, B.B., and Smith, U. 1989. Microdialysis of intercellular adenosine concentration in subcutaneous tissue in humans. *Am. J. Physiol.* **256**(2 Pt 1): E250-E255.

Peltoniemi, P., Lonnroth, P., Laine, H., Oikonen, V., Tolvanen, T., Gronroos, T., Strindberg, L., Knuuti, J., and Nuutila, P. 2000. Lumped constant for [(18)F]fluorodeoxyglucose in skeletal muscles of obese and nonobese humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **279**(5): E1122-E1130.

Saha, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Fourth Edition. , Springer, New York. 1998. 358 p.

Samra, J.S., Simpson, E.J., Clark, M.L., Forster, C.D., Humphreys, S.M., Macdonald, I.A., and Frayn, K.N. 1996. Effects of epinephrine infusion on adipose tissue: interactions between blood flow and lipid metabolism. *Am. J. Physiol.* **271**(5 Pt 1): E834-E839.

Simonsen, L., Bulow, J., Astrup, A., Madsen, J., and Christensen, N.J. 1990. Diet-induced changes in subcutaneous adipose tissue blood flow in man: effect of beta-adrenoceptor inhibition. *Acta Physiol. Scand.* **139**(2): 341-346.

Simonsen, L., Enevoldsen, L.H., and Bulow, J. 2003. Determination of adipose tissue blood flow with local ^{133}Xe clearance. Evaluation of a new labelling technique. *Clin. Physiol. Funct. Imaging* **23**(6): 320-323.

Stallknecht, B., Lorentsen, J., Enevoldsen, L.H., Bulow, J., Biering-Sorensen, F., Galbo, H., and Kjaer, M. 2001. Role of the sympathoadrenergic system in adipose tissue metabolism during exercise in humans. *J. Physiol. (Lond.)* **536**(Pt 1): 283-294.

Summers, L.K., Samra, J.S., and Frayn, K.N. 1999. Impaired postprandial tissue regulation of blood flow in insulin resistance: a determinant of cardiovascular risk? *Atherosclerosis* **147**(1): 11-15.

Summers, L.K., Samra, J.S., Humphreys, S.M., Morris, R.J., and Frayn, K.N. 1996. Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow: variation within and between subjects and relationship to obesity. *Clin. Sci.* **91**(6): 679-683.

Tafeit, E., Moller, R., Pieber, T.R., Sudi, K., and Reibnegger, G. 2000. Differences of subcutaneous adipose tissue topography in type-2 diabetic (NIDDM) women and healthy controls. *Am. J. Phys. Anthropol.* **113**(3): 381-388.

Tan, G.D., Goossens, G.H., Humphreys, S.M., Vidal, H., and Karpe, F. 2004. Upper and lower body adipose tissue function: a direct comparison of fat mobilization in humans. *Obes. Res.* **12**(1): 114-118.

van den Hoff, J., Burchert, W., Borner, A.R., Fricke, H., Kuhnel, G., Meyer, G.J., Otto, D., Weckesser, E., Wolpers, H.G., and Knapp, W.H. 2001. [1-(11)C]Acetate as a quantitative perfusion tracer in myocardial PET. *J. Nucl. Med.* **42**(8): 1174-1182.

Virtanen, K.A., Lonnroth, P., Parkkola, R., Peltoniemi, P., Asola, M., Viljanen, T., Tolvanen, T., Knuuti, J., Ronnema, T., Huupponen, R., and Nuutila, P. 2002. Glucose uptake and perfusion in subcutaneous and visceral adipose tissue during insulin stimulation in nonobese and obese humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**(8): 3902-3910.

Virtanen, K.A., Peltoniemi, P., Marjamaki, P., Asola, M., Strindberg, L., Parkkola, R., Huupponen, R., Knuuti, J., Lonnroth, P., and Nuutila, P. 2001. Human adipose tissue glucose uptake determined using (18)F-fluoro-deoxy-glucose ((18)FFDG) and PET in combination with microdialysis. *Diabetologia* **44**(12): 2171-2179.

Yeh, S.Y. and Peterson, R.E. 1965. Solubility of krypton and xenon in blood, protein solutions, and tissue homogenates. *J. Appl. Physiol.* **20**(5): 1041-1047.

CHAPITRE 3

Énoncé des objectifs du projet de maîtrise

Comme mentionné précédemment, le stockage et la libération d'énergie, de même que la sécrétion d'hormones et d'adipocytokines demandent une régulation précise du FSTA (Frayn *et al.*, 2003). Il a été démontré (Ardilouze, 2004; Blaak *et al.*, 1995; Bulow *et al.*, 1987; Coppack *et al.*, 1992; Jansson *et al.*, 1998) que chez les sujets obèses et/ou insulino-résistants, à jeun, le flot sanguin du TA (FSTA) est 50% inférieur à celui des sujets sains de poids normal. De même, l'augmentation du flot sanguin après les repas est abolie. Ces observations suggèrent que la dérégulation du FSTA pourrait être une composante du syndrome d'insulino-résistance (Karpe *et al.*, 2002a).

À l'aide de la méthode de microinfusion du TA, il a été démontré que dans le TA l'insuline *per se* n'avait pas d'effet vasodilatateur comme c'est le cas dans le muscle squelettique et ce, tant en période pré que postprandiale (Karpe *et al.*, 2002a). Conséquemment, il a été émis comme hypothèse que l'insuline agissait indirectement sur le FSTA *via* l'activation du SNS et que le NO était un régulateur majeur du FSTA basal. Effectivement, le FSTA à jeun est surtout sous le contrôle du NO (Ardilouze *et al.*, 2004a) et de l'Ang II circulante (Goossens *et al.*, 2006), mais également, à un moindre degré, sous l'influence des récepteurs α -adrénergiques (Ardilouze *et al.*, 2004a). L'élévation postprandiale du FSTA est indépendante du NO et est principalement régulée par l'activation des récepteurs β -adrénergiques à 60% (Ardilouze *et al.*, 2004a). La régulation postprandiale du FSTA est complexe et implique probablement d'autres facteurs. Le tonus vasculaire dépend de l'équilibre entre les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs et il est établi que l'endothéline (ET) est le pendant du

NO (Steinberg *et al.*, 1994) pour ce qui est du tonus vasculaire sur les artères de petit et de moyen calibre. Le SNPS a également été montré comme impliqué dans le métabolisme du TA (Kreier *et al.*, 2002). De plus, il a aussi été montré que l'augmentation du FSTA est nettement plus élevée après ingestion orale de 75 g de glucose qu'après infusion intraveineuse de quantités de glucose et d'insuline suffisantes pour donner les mêmes niveaux plasmatiques de glucose et d'insuline (Karpe *et al.*, 2002a). *Les rôles de l'ET, du SNPS et du système gastro-intestinal dans la régulation du FSTA reste à être explorés.*

Le **but** initial de mon projet de maîtrise était donc de : Déterminer le rôle du système nerveux parasympathique, de l'endothéline et des hormones gastro-intestinales dans la régulation du flot sanguin du tissu adipeux in vivo chez l'humain.

Hypothèses : Le SNPS, l'ET et les hormones gastrointestinales jouent un rôle dans la régulation du FSTA chez l'humain.

Objectifs : Investiguer les rôles 1) de l'ET en utilisant des antagonistes, sélectif et non-sélectif des récepteurs ET_A et ET_B, 2) du SNPS à l'aide d'antagonistes, muscarinique et nicotinique, et 3) de l'hormone gastro-intestinale GLP-1, avec le GLP-1 et l'antagoniste de ses récepteurs, l'exendin 9-39. La méthode choisie pour ces études est la méthode de microinfusion du TA. Comme dans un premier temps ces études sont d'ordre physiologique, elles doivent être réalisées chez des sujets sains.

CHAPITRE 4

Résultats et Discussion

Résultats initiaux

Les études sur la régulation du FSTA par la méthode de microinfusion du TA avec le Oakfield Mediscint System ont commencé à l'automne 2006 à Sherbrooke. Rapidement, il est apparu que les résultats obtenus ne correspondaient pas avec ceux retrouvés dans la littérature et que des modifications au protocole devaient être effectuées. Sous la supervision du Dr Ardilouze, dont la thèse de doctorat porte sur la technique de microinfusion du TA, et qui donc a mis la technique au point, toute la méthodologie clinique a été revue. Au mois d'avril 2007, chaque détail expérimental avait été revu, corrigé si nécessaire, et validé. Les modifications apportées ont été, entre autre :

- 1) La seringue pour l'injection du ^{133}Xe *via* le cathéter dans le TA sous-cutané : la longueur de l'aiguille doit être telle que le bout de l'aiguille corresponde avec la fin du cathéter de manière à ce que la quantité de ^{133}Xe injectée soit localisée à l'endroit même où il y aura microinfusion d'agents pharmacologiques.
- 2) Le temps d'injection du ^{133}Xe : le temps d'injection du ^{133}Xe a été modifié à 60 secondes pour empêcher une perte de radio-isotope *via* le cathéter et pour éviter de compresser la microcirculation du TA.

- 3) La microinfusion de solution saline pendant l'injection de ^{133}Xe : l'augmentation du débit de microinfusion de solution saline à 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ pendant la minute d'injection crée un courant qui entraîne le ^{133}Xe vers le TA et évite le refoulement.
- 4) Les sondes de ^{133}Xe sont placées à 3 cm de l'abdomen des sujets afin de diminuer la variation dans les mesures selon la loi de l'inverse de la distance au carré, $1/r^2$, pour la géométrie des détecteurs.
- 5) Le temps adéquat est alloué pour l'atteinte de l'équilibre de diffusion du ^{133}Xe entre le TA et la microcirculation : suite à l'injection du ^{133}Xe dans le TA, une perfusion de solution saline à 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ *via* le cathéter pendant 60 min permet la distribution adéquate du ^{133}Xe entre les compartiments selon son coefficient de partition (λ , voir notre article No2. Dans la littérature concernant le ^{133}Xe et la mesure du flot sanguin dans le tissu adipeux, le coefficient de partition est nommé λ (Yeh. *et al*, 1965.)) et la disparition de l'hyperémie induite par l'injection du traceur.

Malgré une mise en place d'une méthodologie clinique expérimentale optimale, les difficultés dans l'obtention de résultats valides ont persisté. Ci-dessous, un abrégé des résultats obtenus :

- a) 13 expérimentations chez des sujets sains ont été effectuées. Dans aucun cas nous n'avons pu mesurer une élévation de FSTA suivant l'ingestion de 75 g de glucose ce qui, on l'a vu, représente le « repas test » le plus utilisé. Il est vrai qu'il existe une classe de sujets « non-répondeurs », mais avec le nombre de sujets investigués, 13, il

est quasi invraisemblable de ne jamais avoir pu observer une élévation postprandiale de FSTA.

- b) Des stimulations du FSTA avec de l'isoprotérénol à des concentrations pharmacologiques de 1×10^{-5} M et 1×10^{-4} M chez des sujets en bonne santé n'ont pas permis d'obtenir des résultats correspondant avec ceux de la littérature (Karpe *et al.*, 2002a).
- c) En un an, la seule élévation de FSTA mesurée chez un sujet en santé, a été obtenue avec une double stimulation physiologique et pharmacologique, soit un 75 g de glucose ajouté à une microinfusion d'isoprotérénol 1×10^{-4} M. Et encore le FSTA maximal atteint était-il inférieur à ce qui est rapporté dans la littérature.
- d) Chez nos sujets, aucune analyse convaincante des valeurs de base du FSTA n'a pu être effectuée étant donné la grande variation dans les données et ce, même si les sujets étaient calmes et au repos. Certains sujets ont même participé 2 fois à l'expérimentation, éliminant la variable « stress » comme cause potentielle de variabilité.
- e) Il est connu que le FSTA de base à jeun est plus élevé à la partie supérieure de l'abdomen qu'à sa partie inférieure et qu'il n'y a aucune différence dans les valeurs de FSTA entre les 2 côtés de l'abdomen à chacun des deux niveaux (Ardilouze *et al.*, 2004b; Simonsen *et al.*, 2003) Nos enregistrements n'ont montré aucune différence entre les valeurs de FSTA prises au niveau supérieur et inférieur de l'abdomen. De

plus, aucune correspondance entre le côté gauche et droit pour un même niveau de l'abdomen n'a pu être établie.

Tous les enregistrements de FSTA pour cette période ont été étudiés plusieurs fois afin de découvrir un problème potentiel dans le traitement de nos données. À l'été 2007, il a été conclu que le problème de la mesure du FSTA ne se trouvait pas dans la gestion clinique de l'expérimentation, ni dans l'interprétation des données, mais bien au niveau de l'appareil de mesure servant à la collecte des données : le Oakfield Mediscint System.

Objectif révisé

LE TITRE DE MON PROJET DE MAÎTRISE A DONC ÉTÉ RÉVISÉ POUR DEVENIR :
*MESURE DU FLOT SANGUIN DANS LE TISSU ADIPEUX : IMPLANTATION ET MISE
 AU POINT DE LA MÉTHODE À SHERBROOKE.*

But : Déterminer le défaut de fonctionnement de l'appareil de mesure, le Mediscint System.

L'**hypothèse** de travail a également dû être redéfinie : le problème de la mesure du FSTA n'est pas relié au protocole clinique, mais à l'instrument de mesure.

Les **objectif ont aussi été changés** : 1) Investiguer chaque composante de l'appareil de mesure, le Mediscint System, en contexte expérimental afin de déterminer la source du problème dans la prise des mesures de radioactivité. 2) Utiliser des experts externes et 3) faire des tests comparatifs.

L'appareil pour la mesure de la clairance du ^{133}Xe est composé de 3 parties distinctes :

- 1) γ -counter probes (CsI(Tl) scintillator detector, Oakfield Instruments, Eynsham, UK).

Ce sont 4 sondes de détection d'émission de rayonnements radioactifs γ . Le ^{133}Xe , produit de l' $^{235}\text{uranium}$, se désintègre par émission bêta en $^{133}\text{césium}$; son temps de demi-vie physique est de 5,245 jours. Sa désintégration émet un rayonnement γ d'une énergie de 81 KeV. Le rayonnement γ excite le scintillateur dans la sonde qui émet une longueur d'onde de 540 nm. Le nombre de photons lumineux réémis par le cristal est proportionnel à l'énergie cédée par le photon γ incident. Par la suite, une photodiode transforme le signal lumineux en charge électrique (Coulombs).

- 2) Mediscint instrument (Oakfield Instruments). C'est une interface entre les sondes de détections et l'ordinateur contenant le programme d'acquisition des données. Elle convertit la charge électrique en une variation de tension (Volts). La valeur de tension mesurée est donc proportionnelle à la désintégration d'un atome de ^{133}Xe , correspondant à un « *count* ». Le nombre de fois où cette tension est mesurée pendant 20 secondes, correspond au nombre de « *counts* ».

- 3) Spatial Radiation Monitoring System, (S-RaMS, John Caunt Scientific Ltd, Oxford, UK). S-RaMS est un programme qui fournit une méthode de configuration, de contrôle, d'enregistrement et d'analyse des données collectées.

Afin d'investiguer adéquatement les différents points de l'appareil, de l'expertise extérieure à l'équipe de recherche fut sollicitée.

- 1) Jean-Philippe Gauthier ingénieur, étudiant au doctorat, du Centre des technologies avancées BRP de l'université de Sherbrooke a participé à la vérification des paramètres du S-RaMS et a évalué le fonctionnement du Mediscint instrument.
- 2) L'équipe de recherche du Dr George Dimitriadis de l'université d'Athènes, qui possède un Mediscint System pour des études de FSTA, a permis la vérification des paramètres du S-RaMS et des caractéristiques des sondes pour la détection du ^{133}Xe .
- 3) Le Dr G.B. Carey du « Department of Animal and Nutritional Science » de l'université du New Hampshire nous a prêté son Mediscint System pour que nous puissions faire des études comparatives en conditions *ex et in vivo*.

Paramètres du Mediscint System

Les différents paramètres du programme S-RaMS ; sensibilité, calibration, temps mort et valeur seuil, ont été vérifiés et comparés avec ceux de l'équipe de recherche du Dr Dimitriadis. La compagnie fabriquant le Mediscint System (John Caunt Scientific Ltd), que nous avons alors consultée, nous a certifié que les paramètres programmés étaient adéquats pour la mesure du ^{133}Xe et qu'il n'y avait pas lieu de les modifier.

Les caractéristiques de fabrication des sondes de détection ont également été vérifiées. Nous savions que la compagnie Oakfield Instruments avait eu de la difficulté pour la fabrication de nos sondes. Effectivement, les caractéristiques de nos sondes diffèrent de celles de l'équipe du Dr Dimitriadis : il n'y a pas de collimateur dans nos sondes et la valeur du seuil énergétique de détection est différente. Les sondes utilisées en Grèce possèdent un seuil

énergétique supérieur à 80 KeV, c'est-à-dire qu'elles détectent des rayonnements radioactifs γ possédant une énergie supérieure à 80 KeV. Le xénon émettant un rayonnement γ de 81 KeV lors d'une désintégration, ces sondes sont très spécifiques pour la mesure de l'activité du xénon radioactif. Les sondes de notre Mediscint System à Sherbrooke possèdent un seuil énergétique approximatif de 60 KeV. Ces sondes sont capables de mesurer toute énergie γ émise supérieure à 60 KeV. Nos mesures comportent donc un énorme bruit de fond, ce qui pourrait expliquer en partie les variations dans nos mesures. Nos sondes sont donc peu spécifiques à la mesure du ^{133}Xe . Pour ce qui est des autres paramètres tels que le matériel de fabrication et la grandeur du crystal constituant les sondes, les deux appareils correspondent.

Le Mediscint System a également été testé en présence de source radioactive de ^{133}Xe . Ces tests ont permis de déterminer que le système avait une dynamique rapide, la variation dans ces mesures est immédiate selon qu'on ajoute ou retire une source de ^{133}Xe . La mise à la terre de l'appareil est adéquate. Une mise à la terre est nécessaire pour un appareil tel que le Mediscint System qui possède une carcasse métallique, jouant office de cage de Faraday, afin d'éviter les interférences externes et les dangers d'électrocution en cas de problème (ex. un fil électrique dénudé qui toucherait à la carcasse métallique).

De plus, nous avons montré que la capacité de mesurer les signaux radioactifs est indépendante de la température des sondes de détections (en comparant des mesures prises alors nous avons placé les sondes à l'extérieur en plein hiver avec les mesures prises dans la salle d'expérimentation). La température de la pièce où se déroule l'expérimentation clinique, de même que la température sur l'abdomen du participant où sont déposées les sondes, n'interfèrent donc pas avec les valeurs mesurées.

Calibration du Mediscint System

Nous avons aussi noté que le bruit mesuré et la variation dans les valeurs des données enregistrées par l'appareil augmentent si l'on accroît la valeur radioactive de la source. Un phénomène attendu. D'autres tests *ex vivo* ont également été effectués et un pseudo flot sanguin a été simulé. Une seringue contenant du ^{133}Xe était installée sur une pompe à microinfusion et le débit auquel était évacué le gaz radioactif de la seringue vers l'extérieur représentait un flot. Le flot variait en fonction du débit de la pompe qui était modifié aux 10 min. Cette étude a été effectuée en comparant une sonde de chacun des Mediscint System disponibles, soit celui du Dr Carey et le notre. Le pseudo flot enregistré avec notre appareil démontre d'importantes fluctuations quand on compare les données de notre appareil à celles, plus stables, de l'appareil du Dr Carey. Lorsque l'on prend l'intervalle de temps compris entre 10 et 20 min, pour un pseudo FSTA on obtient pour notre système et celui de Dr Carey des valeurs respectives de $7,6 \pm 3,0$ avec un coefficient de variation (CV) de 39% et $2,9 \pm 0,6$ avec un CV acceptable de 20% (Fig 4.1).

Pour un même débit, les valeurs de flot mesurées avec les 2 appareils sont très différentes, ces 2 valeurs distinctes entraînent des interprétations différentes du FSTA. Habituellement, après une nuit, donc suite à un jeûne prolongé, le FSTA se situe entre 3-5 ml.100g tissu⁻¹.min⁻¹. Chez un sujet mince et en santé, le FSTA après un repas peut augmenter jusqu'à 4 fois de sa valeur initiale (Summers *et al.*, 1999). Dans ce cas-ci, selon l'appareil utilisé, les conclusions sur l'état du sujet sont différentes.

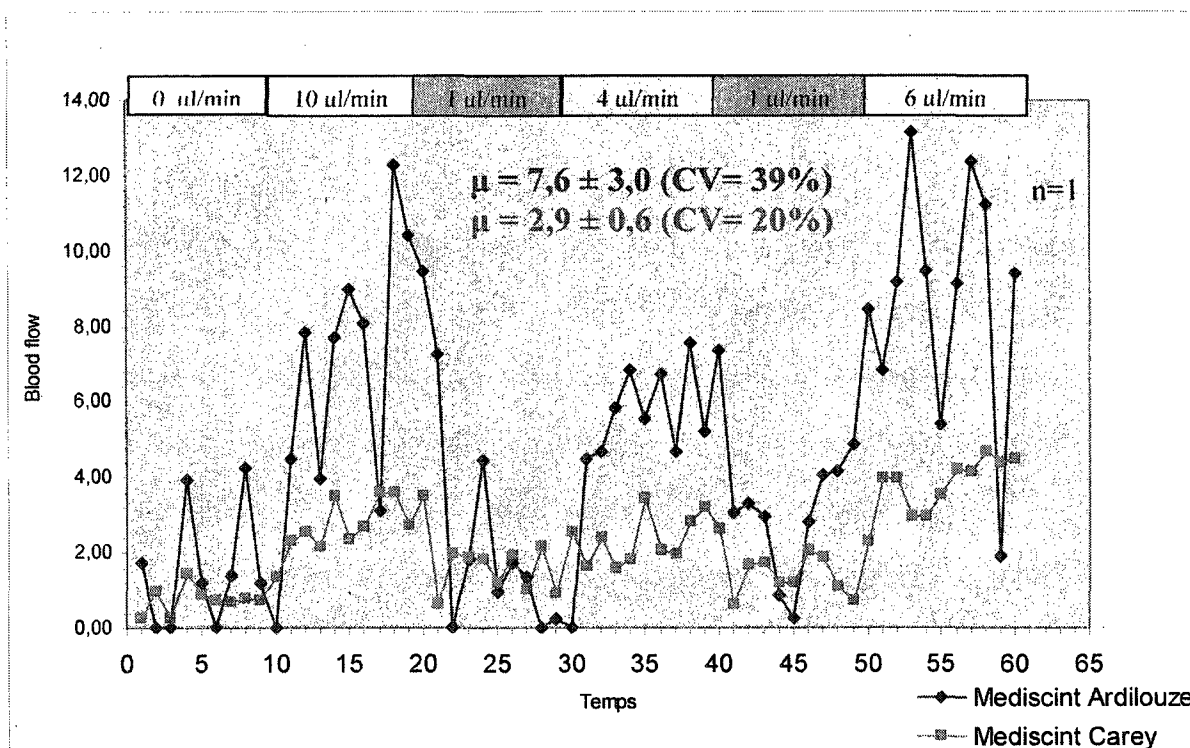


Fig 4.1 – Comparaison des Mediscint System Dr Carey vs Dr Ardilouze. Mesure de variations de pseudo flot par intervalles de 10 min.

Des études comparatives entre les 2 Mediscint System disponibles ont également été effectuées en condition *in vivo* chez 6 sujets jeunes, en santé et en bonne condition physique (i.e. théoriquement de bons répondeurs en condition postprandiale). Le protocole était basé sur des études précédentes (Ardilouze *et al.*, 2004a; Karpe *et al.*, 2002a). Le FSTA était enregistré avec une sonde du Dr Carey d'un côté de l'abdomen et une de nos sondes de l'autre côté. Une 2^e sonde de notre appareil était positionnée à la partie inférieure de l'abdomen du même côté que son homologue à titre de contrôle. Le FSTA basal était enregistré sur une période de 30 min pendant une microinfusion, via les 3 cathéters, de solution saline à un débit de 2 μ l/min. Par la suite, un bolus de 75 g de glucose oral était administré au sujet. Une période de 2h30 min était allouée pour la mesure du FSTA postprandial. Cet intervalle de temps était suivi d'une microinfusion d'isoprotérénol (ISO, 1

$\times 10^{-4}$ M, 2 μ l/min) pour 2 sites, ou de salin (site contrôle) pour 40 min. L'activité radioactive pour les 2 sites microperfusés avec de l'ISO était enregistrée avec une sonde du Dr Carey et une de nos sondes. L'activité radioactive au site contrôle recevant du salin était mesurée par une de nos sondes. Les résultats enregistrés par le Mediscint System de Sherbrooke ont donné des réponses contrastantes avec celles retrouvées dans la littérature. Les réponses postprandiales affichées par l'appareil étaient retardées, l'augmentation maximale enregistrée survenaient 130 à 140 min suivant le repas comparée à 40 min habituellement. Les mesures de FSTA n'affichaient pas de tendance de retour vers leurs valeurs initiales, et ce même après 2h30 min suivant l'ingestion du « repas » de 75 g de glucose. Suite à la stimulation avec l'ISO 1×10^{-4} M, l'élévation de FSTA enregistrée était de 40% par rapport à la valeur basale, une faible élévation considérant ce que la littérature rapporte dans ces mêmes conditions expérimentales, soit des chiffres de l'ordre de 200% et plus (Karpe *et al.*, 2002a). Étonnamment, le Mediscint System fourni par le Dr Carey n'a pas non plus montré des résultats attendus d'après la littérature. Suivant la stimulation avec l'ISO 1×10^{-4} M, l'élévation de FSTA enregistrée n'était que de 40 à 50%. Il est difficile pour nous d'associer ces résultats à un mauvais protocole expérimental puisque nous l'avons comparé avec ceux des autres équipes qui utilisent la même technique et toutes les étapes sont respectées.

L'appareil du Dr Carey fait partie de la première génération des Mediscint System fabriqués. Il date de 2001. Depuis 2004, le Dr Carey n'effectue plus de mesure du FSTA et entrepose son appareil dans une ferme porcine. Les conditions d'entreposage ont probablement endommagé ses qualités de sensibilité de détection. Malheureusement, c'est le seul appareil avec lequel nous avons pu comparer le notre.

Lorsque nous observons les 6 courbes de FSTA enregistrées par notre Mediscint System chez les 6 sujets, l'écart-type calculé est tel qu'aucune différence ne peut être démontrée, et ce même après stimulation pharmacologique (Fig 4.2). Ces données ne sont ni utilisables, ni interprétables. Ce ne sont pas des résultats sur lesquels nous pouvons nous baser pour émettre des conclusions. Nous ne croyons pas aux valeurs enregistrées par notre appareil.

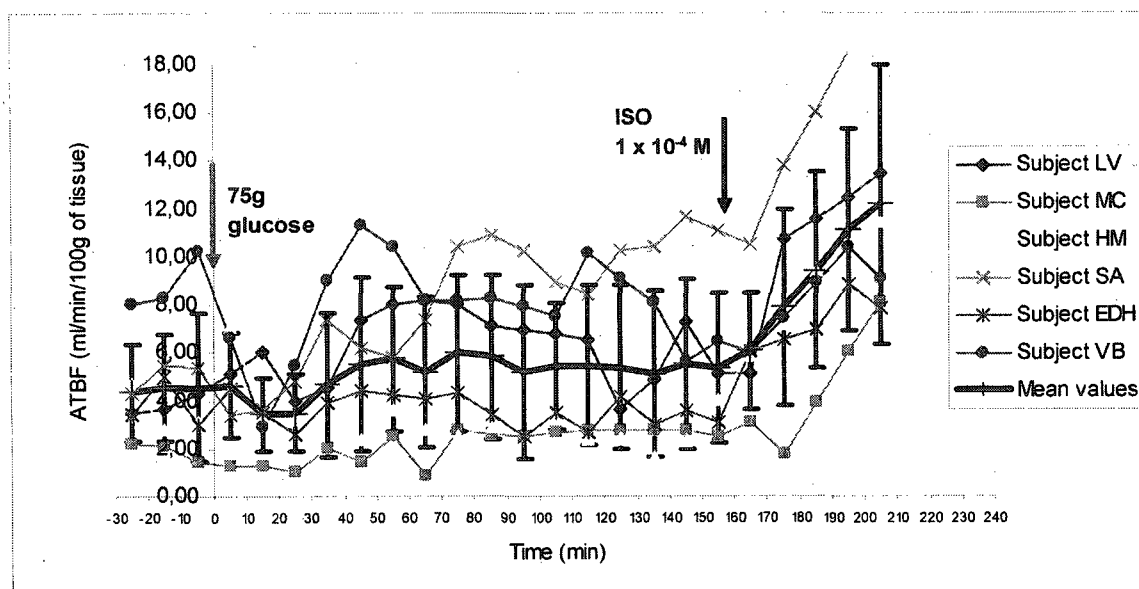


Fig 4.2 – Stimulation du FSTA par microinfusion d'isoprotérénol 10^{-4} M chez 6 sujets. Mesures effectuées avec notre Mediscint System. La flèche rouge représente l'ingestion de 75g de glucose par les sujets, et la flèche noir représente le début de l'infusion d'ISO 1×10^{-4} M.

En effet, le protocole expérimental est maintenant optimal. Des expérimentations *ex* et *in vivo* ont été effectuées pour vérifier tous les éléments du Mediscint System. L'expertise d'un ingénieur et d'autres équipes (Dr Dimitriadis, Dr Carey) ont été sollicitées. Malgré tout, nous continuons à être incapables d'enregistrer des valeurs de FSTA réalistes. Cette odyssée dure depuis 2005. Ces expériences ont démontré que le problème dans la mesure des *counts* de ^{133}Xe ne provenait ni du programme S-RAMS, ni des paramètres de détection du Mediscint instrument. Selon nous, le problème se situe dans la grande variation des valeurs de FSTA calculées dans un laps de temps, ce qui empêche d'observer les variations physiologiques de

flot. La détection de la radioactivité par les sondes du Mediscint System semble également être problématique, est-ce un problème de sensibilité?

Fin avril 2008, la compagnie John Caunt Scientific Ltd comprend finalement que notre Mediscint System contient des défauts et décide de le reprendre pour effectuer des tests et les corrections nécessaires pour le rendre fonctionnel. Elle évaluera la sensibilité des sondes, la valeur seuil de détection des sondes, la sensibilité des sondes aux radiofréquences et la synchronisation de l'appareil.

Notre Mediscint System est donc retourné à la compagnie en Angleterre. Plusieurs actions y ont été posées dans le but d'améliorer le fonctionnement de l'appareil. Au moment d'écrire ces lignes, le Mediscint System ne nous a toujours pas été retourné.

- 1) La quatrième et dernière version du programme S-RaMS a été installée. Bien que selon nous le problème ne se situe pas au niveau du programme, c'est une mise à jour intéressante puisque nous possédions la toute première version.
- 2) La sensibilité des sondes a été ajustée à la même valeur.
- 3) Il y a eu désassemblage complet des sondes afin d'en diminuer le bruit interne, détail probablement responsable de la grande variation dans les données enregistrées par le programme.
- 4) Des tests plus techniques ont été effectués en conditions *ex vivo* sur l'appareil.

- 5) Finalement il y a également eu validation du bon fonctionnement de l'appareil réparé en conditions cliniques et le Dr Manolopoulos, étudiant au PhD, a mesuré le FSTA chez certains de ses volontaires à Oxford. À ce jour, les tests semblent indiquer que notre Mediscint System fonctionne adéquatement pour la mesure du FSTA par la méthode de microinfusion du TA. Il devrait revenir à Sherbrooke sous peu, prêt à entrer en fonction pour l'investigation de nos hypothèses sur la régulation du FSTA.

Expériences acquises

Toutes ces expérimentations sur la mesure du FSTA en conditions *ex* et *in vivo*, afin de démontrer la non fonctionnalité de l'appareil de mesure, ont demandé beaucoup de mon temps durant ces 2 années de maîtrise. Du côté « résultats », je n'en ai aucun. Par contre, du côté « apprentissage », « acquisition de connaissance », objectifs de tout étudiant à la maîtrise, j'ai récolté beaucoup.

- a) Tout d'abord, j'ai connu le « mauvais » côté de la science. Tout ne va pas toujours bien, ce n'est pas aussi simple que l'on croit. Je dois dire que j'ai découvert que j'étais une personne assez optimiste !
- b) Sur le plan scientifique, j'ai appris la méthode scientifique, la démarche de résolution d'un problème, j'ai acquis des connaissances en gestion clinique, en médecine nucléaire, quelques principes de génie électrique.
- c) Je me suis également impliquée dans d'autres projets du laboratoire. J'ai effectué des ELISA pour déterminer la concentration plasmatique de

« monocyte chemotactic protein » (MCP-1), une protéine qui induit le recrutement des monocytes dans le processus inflammatoire, d'échantillons plasmatique de patients diabétiques. J'ai également participé à une méthode d'isolation différentielle des leucocytes sur gradient discontinu à l'aide de l'Optiprep.

- d) J'ai appris à rédiger une demande de bourse et j'en ai obtenu 3 : une de Diabète Québec, une de la faculté de médecine et des sciences de la santé de l'université de Sherbrooke et une des Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) comme étudiante d'été.

- e) J'ai aussi implanté la mesure du FSTA dans le projet AGL4 de l'équipe du Dr André C. Carpentier à l'université de Sherbrooke qui s'intitule: "Rôle de la lipolyse intravasculaire et de l'apport exogène de gras dans le métabolisme postprandial des AGL plasmatiques, la fonction du tissu adipeux ainsi que la modulation du système immunitaire inné et acquis dans le syndrome métabolique". Notre but est de mesurer le FSTA en condition de résistance à l'insuline et après un repas d'acides gras saturés seulement et après un repas d'acides gras polyinsaturés seulement. Bien que les mesures de FSTA effectuées jusqu'à maintenant ne sont pas valides pour émettre des conclusions, la mise en place de la mesure dans l'étude est accomplie. Quand notre appareil va revenir d'Angleterre, nous serons prêts à faire des enregistrements valables, l'équipe est rodée.

- f) Dernièrement, j'ai aussi rédigé une proposition de protocole de recherche soumise à une compagnie pharmaceutique. Cette demande s'intitule: « A new facet of the incretin effect: post prandial regulation of blood flow in adipose tissue » (voir annexe). Je l'ajoute en annexe de mon mémoire pour démontrer des accomplissements supplémentaires à mon projet initial.
- g) De plus, à l'été 2007 notre équipe de recherche a créé la Clinique de prélèvements et de recherche pendant la grossesse du CHUS. En plus de tous les prélèvements reliés à la grossesse, la clinique participe entre autres choses au dépistage précoce du diabète gestationnel. Les femmes obtenant une valeur de glycémie supérieure ou égale à 7,2 mmol/L 1 heure suivant l'ingestion d'un jus contenant 50g de glucose doivent effectuer la mesure de leurs glycémies capillaires 4 fois par jour durant 7 jours. À la clinique, les femmes reçoivent donc un rapide enseignement sur le fonctionnement d'un glucomètre et la manière adéquate de l'utiliser. Un suivi téléphonique est effectué une semaine plus tard. Durant une période de l'été 2008, j'ai donné ces enseignements. En plus d'une expertise scientifique, je suis allée me chercher de l'expérience de vulgarisation avec une population cible.

Mon projet de maîtrise n'a peut-être pas donné les résultats escomptés au départ, par contre, cela m'a permis de toucher à plusieurs domaines. En plus des connaissances techniques apprises, j'ai également su développer des aptitudes de vulgarisation, d'écriture, de persévérance et d'autonomie. Je suis capable de travailler en équipe et aller chercher l'information dont j'ai besoin pour mettre mes projets à terme. Ces acquis me seront très utiles pour mes cheminements futurs.

Preuves à l'appui

Mi-mars 2009, le Mediscint System est de retour dans nos laboratoires et prêt à entrer en fonction. Les sondes servant à la mesure du rayonnement γ du ^{133}Xe ont été modifiées et testées par la compagnie John Caunt Scientific en Angleterre. Le 16 et le 28 avril 2009 des tests de validité de l'appareil en contexte expérimental clinique sur des sujets humains sains ont été effectués (Fig 4.3). Afin de pouvoir mesurer le FSTA après simulation physiologique

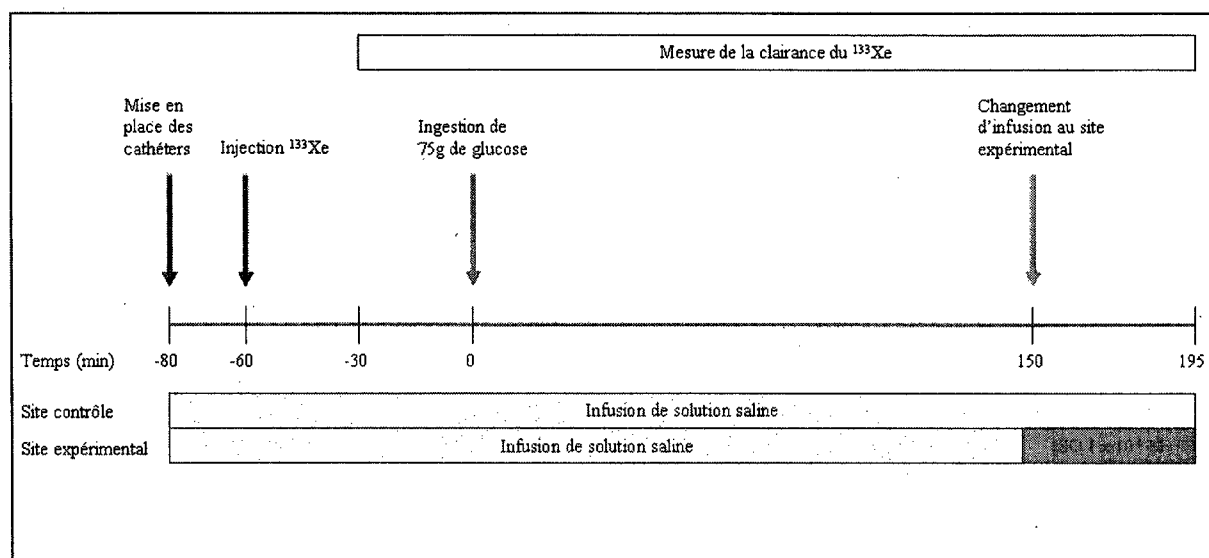


Fig 4.3 – Déroulement des tests de validité : Mesure du FSTA à 2 sites au niveau de la partie supérieure de l'abdomen. Les sites sont situés sur une même ligne parallèle à 5 cm au-dessus du nombril, à une distance de 6-8 cm. Mesure de la clairance du ^{133}Xe du temps -30 à 195 min. Ingestion de 75 g de glucose au temps 0. À 150 min, changement d'infusion au site expérimental pour de l'ISO 1 x 10⁻⁴ M.

et pharmacologique, un 75 g de glucose a été donné aux sujets, suivi d'une infusion d'ISO 1 x 10⁻⁴ M 150 min plus tard. Excepté cette double simulation, la méthodologie pour la mesure du FSTA fut la même que celle décrite précédemment. L'objectif des ces tests de validité était de vérifier si la mesure de la clairance du ^{133}Xe avec le Mediscint System ajusté permettait d'obtenir des résultats de FSTA comparables à ceux retrouvés dans la littérature

lors d'une stimulation physiologique suite à l'ingestion de 75g de glucose et/ou lors d'une infusion d'ISO 1×10^{-4} M.

Suivant un jeûne d'une nuit, le FSTA abdominal se situe habituellement en moyenne entre 3 et 5 ml/min/100 g de tissu (Elia *et al.*, 1993). Chez les 2 sujets étudiés, le FSTA à jeun, au temps 0, variait selon les sites et les individus entre 1,7 et 5 ml/min/100 g de tissu (Fig 4.4 et 4.5). Évidemment, seulement 2 sujets ont été étudiés, ce qui ne permet sans doute pas d'établir de conclusion définitive. En revanche, après comparaison avec d'autres résultats obtenus par mon superviseur ou dans la littérature, nous pensons que ces résultats sont tout à fait valides et représentatifs de ce que l'on s'attend à trouver chez des sujets sains.

Chez des sujets en santé et de poids normal, comme les 2 participants aux tests de validité, le FSTA abdominal s'élève de 2 à 3 fois au-dessus de sa valeur initiale suite à un stimulus nutritionnel oral. Cette élévation de FSTA est observée 30 à 60 min suivant l'ingestion du repas (Karpe *et al.*, 2002; Bülow *et al.*, 1987). Lors des 2 études effectuées, le FSTA suite à l'ingestion de 75 g de glucose au temps 0 s'élève 2 fois au-dessus de sa valeur initiale. Le pic maximal est atteint dans les 50 min suivant la prise de glucose oral. Suite à l'infusion d'ISO 1×10^{-4} M, on observe une élévation de 3 fois du FSTA aux sites expérimentaux chez les 2 sujets par rapport aux valeurs de FSTA précédant le début de l'infusion. Cette élévation concorde encore une fois avec les résultats retrouvés dans la littérature (Ardilouze, 2004).

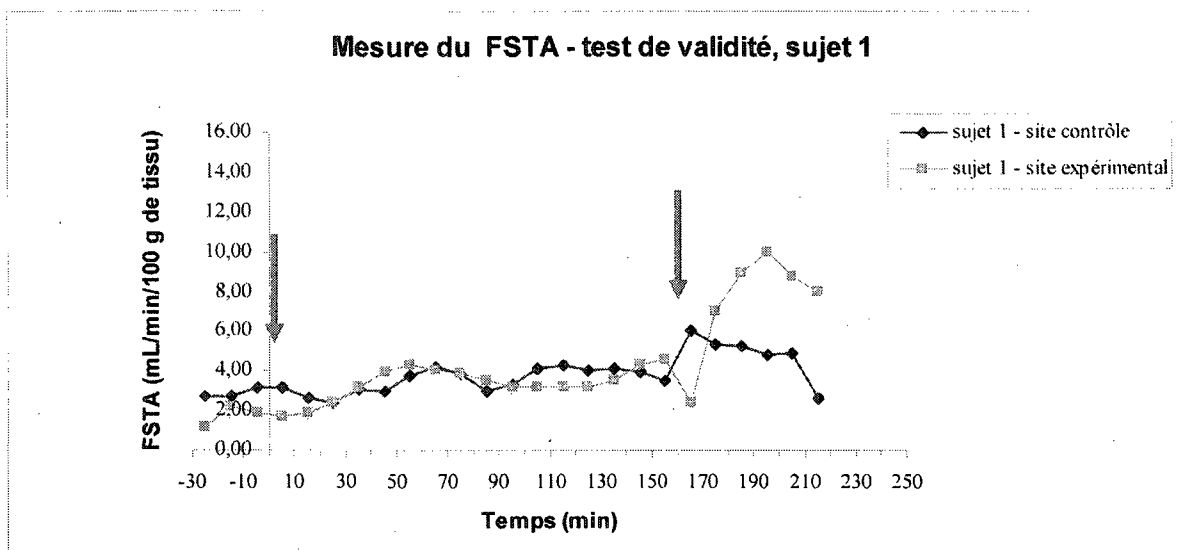


Fig 4.4 – Mesure du FSTA – test de validité, sujet 1. Mesure du FSTA chez un sujet sain et de poids normal afin de tester la fonctionnalité de l'appareil de mesure de la clairance du ^{133}Xe , le Mediscint System. La flèche rouge indique le moment de l'ingestion du 75 g de glucose et la flèche rose, le début de l'infusion de l'ISO 1×10^{-4} M au site expérimental. Le site contrôle est infusé avec de la solution saline tout au long de l'expérimentation.

Ces tests de validité ont permis de confirmer que les changements effectués sur le Mediscint Système ont rendu l'appareil utilisable pour les mesures de FSTA chez l'humain. Les résultats correspondent à ceux retrouvés dans la littérature. Ces tests permettent également de conclure une fois de plus que notre hypothèse quant à la non fonctionnalité de l'appareil de mesure, le Mediscint System, pour les mesures de FSTA, était valable.

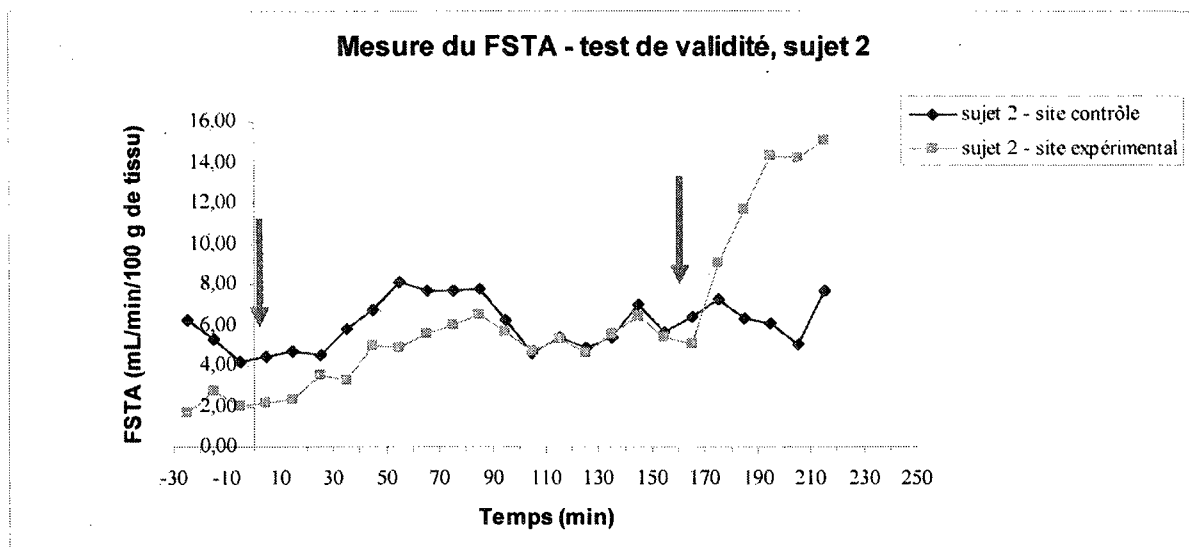


Fig 4.5 – Mesure du FSTA – test de validité, sujet 2. Mesure du FSTA chez un sujet sain et de poids normal afin de tester la fonctionnalité de l'appareil de mesure de la clairance du ^{133}Xe , le Mediscint System. La flèche rouge indique le moment de l'ingestion du 75 g de glucose et la flèche rose, le début de l'infusion de l'ISO 1×10^{-4} M au site expérimental. Le site contrôle est infusé avec de la solution saline tout au long de l'expérimentation.

Ces 2 expériences nous permettent également de valider les modifications que nous avons apportées au protocole de mesure du FSTA. Devant les résultats obtenus chez les 2 sujets, nous pouvons confirmer que notre méthodologie est optimale.

CHAPITRE 5

Conclusion et perspectives

Le FSTA est un sujet d'étude fascinant lorsque l'on réalise l'importance de son rôle dans l'activité métabolique complexe du tissu adipeux et que l'on met cette physiologie dans la perspective de l'épidémie mondiale d'obésité.

Certes, mes premiers objectifs de maîtrise n'ont pu être réalisés et cet échec relatif est dû à une défectuosité de l'appareil de mesure. Par contre, nous avons plusieurs succès à notre actif. Première étape à ces études, j'ai pu mettre au point la méthode de mesure du FSTA à Sherbrooke, la microinfusion du TA, par l'application de la démarche scientifique. Nous avons identifié le problème et posé les actions pour le résoudre. Entre temps, j'ai écrit deux articles de revue ; *Update on adipose tissue blood flow regulation* et *A new technique to investigate the metabolism and pharmacology of adipose tissue*, en plus de m'impliquer sur d'autres projets de notre équipe de recherche et du service d'endocrinologie.

Maintenant que le Mediscint System est revenu à Sherbrooke en état de fonctionner et que des tests de validité de l'appareil sur la mesure du FSTA ont été effectués, nous sommes en mesure de :

1. Réaliser mes premiers objectifs de maîtrise :

Nous allons être les 1ers à explorer le rôle du SNPS dans la régulation du FSTA, à déterminer le rôle du GLP-1 sur le FSTA et nous allons compléter avec l'étude de

l'ET : puisqu'il a été démontré que le NO est vasodilatateur, l'ET devrait être vasoconstrictrice.

2. Tenter de découvrir quels sont les mécanismes qui modifient le FSTA chez les sujets insulino-résistants
3. Tenter de découvrir quels sont les anomalies dans la régulation du FSTA chez les non-répondeurs de poids normal, une nouvelle entité à risque.
4. Valider (en collaboration avec Dr André Carpentier) l'utilisation de [^{11}C]-acétate pour la mesure du FSTA avec la méthode d'imagerie TEP et la méthode de microinfusion dans le but d'effectuer des études de FSTA simultanément avec des études métaboliques.
5. Investiguer (en collaboration avec Dr Rémi Rabassa-Lhoret, Université de Montréal) le FSTA dans une population très particulière, les obèses métaboliquement normaux et les normaux métaboliquement obèses.

On voit que beaucoup de travail reste à faire dans le domaine de la recherche sur la régulation du FSTA, un domaine important pour notre compréhension des mécanismes de développement du syndrome d'insulino-résistance au diabète de type 2 et des maladies cardiovasculaires. Nous sommes sur la bonne voie!

REMERCIEMENTS

Ce mémoire de maîtrise n'aurait pu être réalisé sans la précieuse collaboration et le support de plusieurs personnes.

Tout d'abord, il est essentiel d'exprimer toute ma gratitude envers le Dr Jean-Luc Ardilouze pour m'avoir accueillie dans son équipe de recherche et cru en moi. Ses qualités d'enseignant, sa motivation, son audace, son expérience et ses nombreux encouragements ont été indispensables à ma réussite.

Je tiens également à remercier toute l'équipe de laboratoire du Dr Ardilouze, particulièrement les Drs Julie Ménard et Pascal Brassard pour leurs précieux conseils, leurs mots d'encouragements et leur amitié. L'ambiance qui règne au sein de l'équipe m'a motivée à me dépasser, mais surtout à apprécier mes 2 années passées à la maîtrise.

Je remercie Dr Guy Lamoureux pour son expertise en imagerie médicale, Dr Catherine Pépin pour ses connaissances et ses nombreuses explications sur le fonctionnement de la détection de la radioactivité et Jean-Philippe Gauthier, ingénieur, pour sa collaboration dans les tests *ex vivo* de l'appareil de mesure, le Mediscint System. Je remercie également le Dr Gale Carey qui nous a permis d'emprunter son Mediscint System et qui a répondu à nos nombreuses questions, tant sur la méthodologie de la mesure du flot sanguin dans le tissu adipeux, que sur l'enjeu des élections américaines. Ce fut une rencontre très enrichissante!

Je m'en voudrais de ne pas souligner la précieuse collaboration du groupe de recherche en diabétologie et des infirmières Marie-Josée Gosselin, Diane Lessard et Carol-Lynn Thibodeau.

Un merci tout particulier à ma famille et mes amis pour leur support constant, leur intérêt face à l'avancement de mon projet et leur compréhension. À mes parents, qui m'ont transmis le goût de me dépasser et d'aller au fond des choses, merci, je ne serais sûrement pas rendue là où je suis sans eux.

Finalement, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont accepté de participer à mon projet en tant que sujets d'études. Sans vous, mon projet n'aurait pas été possible.

Un dernier merci aux Drs Emanuel Escher et Eric Rousseau pour avoir accepté d'être membres de mon jury.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Andersson, K. et Arner, P. (1995). Cholinoceptor-mediated effects on glycerol output from human adipose tissue using in situ microdialysis. *British journal of pharmacology*, vol. 115, n° 7, p. 1155-1162.
- Ardilouze, J.L. (2004). *Regulation of adipose tissue blood flow in humans*, PhD thesis. University of Oxford, p. 1-251.
- Ardilouze, J.L., Fielding, B.A., Currie, J.M., Frayn, K.N. et Karpe, F. (2004a). Nitric oxide and beta-adrenergic stimulation are major regulators of preprandial and postprandial subcutaneous adipose tissue blood flow in humans.[see comment]. *Circulation*, vol. 109, n° 1, p. 47-52.
- Ardilouze, J.L., Karpe, F., Currie, J.M., Frayn, K.N. et Fielding, B.A. (2004b). Subcutaneous adipose tissue blood flow varies between superior and inferior levels of the anterior abdominal wall. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 28, n° 2, p. 228-233.
- Arner, P., Kriegholm, E., Engfeldt, P. et Bolinder, J. (1990). Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 85, n° 3, p. 893-898.
- Baldo, A., Sniderman, A.D., St-Luce, S., Avramoglu, R.K., Maslowska, M., Hoang, B., Monge, J.C., Bell, A., Mulay, S. et Cianflone, K. (1993). The adipsin-acylation

stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 92, n° 3, p. 1543-1547.

Bamshad, M., Aoki, V.T., Adkison, M.G., Warren, W.S. et Bartness, T.J. (1998). Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *American Journal of Physiology*, vol. 275, n° 1 Pt 2, p. R291-9.

Bartness, T.J. et Song, C.K. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Sympathetic and sensory innervation of white adipose tissue. *Journal of lipid research*, vol. 48, n° 8, p. 1655-1672.

Bjorntorp, P. (1996). The regulation of adipose tissue distribution in humans. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 20, n° 4, p. 291-302.

Bjorntorp, P., Hood, B., Martinsson, A. et Persson, B. (1966). The composition of human subcutaneous adipose tissue in obesity. *Acta Medica Scandinavica*, vol. 180, n° 1, p. 117-121.

Blaak, E.E., van Baak, M.A., Kemerink, G.J., Pakbiers, M.T., Heidendal, G.A. et Saris, W.H. (1995). Beta-adrenergic stimulation and abdominal subcutaneous fat blood flow in lean, obese, and reduced-obese subjects. *Metabolism: Clinical & Experimental*, vol. 44, n° 2, p. 183-187.

Boss, O., Muzzin, P. et Giacobino, J.P. (1998). The uncoupling proteins, a review. *European Journal of Endocrinology*, vol. 139, n° 1, p. 1-9.

- Boulton, K.L., Hudson, D.U., Coppack, S.W. et Frayn, K.N. (1992). Steroid hormone interconversions in human adipose tissue in vivo. *Metabolism: Clinical & Experimental*, vol. 41, n° 5, p. 556-559.
- Bulow, J., Astrup, A., Christensen, N.J. et Kastrup, J. (1987). Blood flow in skin, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in the forearm of normal man during an oral glucose load. *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 130, n° 4, p. 657-661.
- Burgoyne, R.D. et Clague, M.J. (2003). Calcium and calmodulin in membrane fusion. *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1641, n° 2-3, p. 137-143.
- Campbell, P.J., Carlson, M.G., Hill, J.O. et Nurjhan, N. (1992). Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification. *American Journal of Physiology*, vol. 263, n° 6 Pt 1, p. E1063-9.
- Clifford, G.M., Londos, C., Kraemer, F.B., Vernon, R.G. et Yeaman, S.J. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 7, p. 5011-5015.
- Coppack, S.W., Evans, R.D., Fisher, R.M., Frayn, K.N., Gibbons, G.F., Humphreys, S.M., Kirk, M.L., Potts, J.L. et Hockaday, T.D. (1992). Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism: Clinical & Experimental*, vol. 41, n° 3, p. 264-272.
- Coppack, S.W., Frayn, K.N., Humphreys, S.M., Dhar, H. et Hockaday, T.D. (1989). Effects of insulin on human adipose tissue metabolism in vivo. *Clinical science*, vol. 77, n° 6, p. 663-670.

- Crandall, D.L., Hausman, G.J. et Kral, J.G. (1997). A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*, vol. 4, n° 2, p. 211-232.
- Di Girolamo, M., Skinner, N.S., Jr, Hanley, H.G. et Sachs, R.G. (1971). Relationship of adipose tissue blood flow to fat cell size and number. *American Journal of Physiology*, vol. 220, n° 4, p. 932-937.
- Dimitriadis, G., Lambadiari, V., Mitrou, P., Maratou, E., Boutati, E., Panagiotakos, D.B., Economopoulos, T. et Raptis, S.A. (2007). Impaired postprandial blood flow in the adipose tissue may be an early marker of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes care*,
- Dodt, C., Lonnroth, P., Wellhoner, J.P., Fehm, H.L. et Elam, M. (2003). Sympathetic control of white adipose tissue in lean and obese humans. *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 177, n° 3, p. 351-357.
- Field, C.J., Goruk, S.D., Wierzbicki, A.A. et Clandinin, M.T. (1989). The effect of dietary fat content and composition on adipocyte lipids in normal and diabetic states. *International journal of obesity*, vol. 13, n° 6, p. 747-756.
- Fielding, B.A. et Frayn, K.N. (1998). Lipoprotein lipase and the disposition of dietary fatty acids. *British Journal of Nutrition*, vol. 80, n° 6, p. 495-502.
- Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A. et Coppack, S.W. (2003). Integrative physiology of human adipose tissue. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 27, n° 8, p. 875-888.

- Frayn, K.N., Shadid, S., Hamrani, R., Humphreys, S.M., Clark, M.L., Fielding, B.A., Boland, O. et Coppack, S.W. (1994). Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *American Journal of Physiology*, vol. 266, n° 3 Pt 1, p. E308-17.
- Fredholm, B.B., Linde, B., Oberg, B. et Rosell, S. (1969). Studies on the capillary exchange function in canine subcutaneous adipose tissue. *Bibliotheca anatomica*, vol. 10, p. 241-243.
- Fruhbeck, G., Gomez-Ambrosi, J., Muruzabal, F.J. et Burrell, M.A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism*, vol. 280, n° 6, p. E827-47.
- Gartner, L.P. et Hiatt, J.L. (2004). *Atlas en couleur d'histologie*. 2e édition édition, Belin, Éditions Pradel, 397 p.
- Gersh, I. et Still, M. (1945). Blood vessels in fat tissue: relation to problem of gaz exchange. *J Exp Med*, vol. 81, p. 219-232.
- Gesta, S., Tseng, Y.H. et Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell*, vol. 131, n° 2, p. 242-256.
- Goossens, G.H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior*, vol. 94, n° 2, p. 206-218.
- Goossens, G.H., McQuaid, S.E., Dennis, A.L., van Baak, M.A., Blaak, E.E., Frayn, K.N., Saris, W.H. et Karpe, F. (2006). Angiotensin II: a major regulator of subcutaneous

- adipose tissue blood flow in humans. *Journal of Physiology*, vol. 571, n° Pt 2, p. 451-460.
- Gurr, M.I. et Kirtland, J. (1978). Adipose tissue cellularity: a review. I. Techniques for studying cellularity. *International journal of obesity*, vol. 2, n° 4, p. 401-427.
- Hauner, H. et Hochberg, Z. (2002). Endocrinology of adipose tissue. *Hormone & Metabolic Research*, vol. 34, n° 11-12, p. 605-606.
- Jansson, P.A., Larsson, A. et Lonnroth, P.N. (1998). Relationship between blood pressure, metabolic variables and blood flow in obese subjects with or without non-insulin-dependent diabetes mellitus. *European journal of clinical investigation*, vol. 28, n° 10, p. 813-818.
- Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R.E., Ahmadian, M. et Sook, H.S. (2007). Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *American journal of physiology – gastrointestinal and liver physiology*, vol. 293, p. G1-G4.
- Jensen, M.D. (2002). Adipose tissue and fatty acid metabolism in humans. *Journal of the Royal Society of Medicine*, vol. 95, n° Suppl 42, p. 3-7.
- Karlsson, A.K., Attvall, S., Jansson, P.A., Sullivan, L. et Lonnroth, P. (1995). Influence of the sympathetic nervous system on insulin sensitivity and adipose tissue metabolism: a study in spinal cord-injured subjects. *Metabolism: Clinical & Experimental*, vol. 44, n° 1, p. 52-58.
- Karlsson, A.K., Elam, M., Friberg, P., Biering-Sorensen, F., Sullivan, L. et Lonnroth, P. (1997). Regulation of lipolysis by the sympathetic nervous system: a microdialysis study

in normal and spinal cord-injured subjects. *Metabolism: Clinical & Experimental*, vol. 46, n° 4, p. 388-394.

Karpe, F., Fielding, B.A., Ardilouze, J.L., Ilic, V., Macdonald, I.A. et Frayn, K.N. (2002a). Effects of insulin on adipose tissue blood flow in man. *Journal of Physiology*, vol. 540, n° Pt 3, p. 1087-1093.

Karpe, F., Fielding, B.A., Ilic, V., Macdonald, I.A., Summers, L.K. et Frayn, K.N. (2002b). Impaired postprandial adipose tissue blood flow response is related to aspects of insulin sensitivity. *Diabetes*, vol. 51, n° 8, p. 2467-2473.

Karpe, F., Steiner, G., Olivecrona, T., Carlson, L.A. et Hamsten, A. (1993). Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 91, n° 3, p. 748-758.

Katz, J.R., Mohamed-Ali, V., Wood, P.J., Yudkin, J.S. et Coppack, S.W. (1999). An in vivo study of the cortisol-cortisone shuttle in subcutaneous abdominal adipose tissue. *Clinical endocrinology*, vol. 50, n° 1, p. 63-68.

Kershaw, E.E. et Flier, J.S. (2004). Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 89, n° 6, p. 2548-2556.

Kreier, F., Fliers, E., Voshol, P.J., Van Eden, C.G., Havekes, L.M., Kalsbeek, A., Van Heijningen, C.L., Sluiter, A.A., Mettenleiter, T.C., Romijn, J.A., Sauerwein, H.P. et Buijs, R.M. (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, n° 9, p. 1243-1250.

- Langin, D., Holm, C. et Lafontan, M. (1996). Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 55, n° 1B, p. 93-109.
- Lindbom, L. (1983). Microvascular blood flow distribution in skeletal muscle. An intravital microscopic study in the rabbit. *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 525, n° Supplementum. 525, p. 1-40.
- Olivecrona, G. et Olivecrona, T. (1995). Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*, vol. 6, n° 5, p. 291-305.
- Peeva, E., Brun, L.D., Ven Murthy, M.R., Despres, J.P., Normand, T., Gagne, C., Lupien, P.J. et Julien, P. (1992). Adipose cell size and distribution in familial lipoprotein lipase deficiency. *International Journal of Obesity & Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, vol. 16, n° 10, p. 737-744.
- Pond, C.M. et Mattacks, C.A. (1995). Interactions between adipose tissue around lymph nodes and lymphoid cells in vitro. *Journal of lipid research*, vol. 36, n° 10, p. 2219-2231.
- Raclot, T. et Groscolas, R. (1995). Selective mobilization of adipose tissue fatty acids during energy depletion in the rat. *Journal of lipid research*, vol. 36, n° 10, p. 2164-2173.
- Rebuffe-Scrive, M. (1991). Neuroregulation of adipose tissue: molecular and hormonal mechanisms. *International journal of obesity*, vol. 15, n° Suppl 2, p. 83-86.
- Rosell, S. et Belfrage, E. (1979). Blood circulation in adipose tissue. *Physiological reviews*, vol. 59, n° 4, p. 1078-1104.

- Ryan, T.J. et Curri, S.B. (1989). The development of adipose tissue and its relationship to the vascular system. *Clinics in dermatology*, vol. 7, n° 4, p. 1-8.
- Saleh, J., Summers, L.K., Cianflone, K., Fielding, B.A., Sniderman, A.D. et Frayn, K.N. (1998). Coordinated release of acylation stimulating protein (ASP) and triacylglycerol clearance by human adipose tissue in vivo in the postprandial period. *Journal of lipid research*, vol. 39, n° 4, p. 884-891.
- Samra, J.S., Clark, M.L., Humphreys, S.M., MacDonald, I.A., Bannister, P.A., Matthews, D.R. et Frayn, K.N. (1999). Suppression of the nocturnal rise in growth hormone reduces subsequent lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *European journal of clinical investigation*, vol. 29, n° 12, p. 1045-1052.
- Samra, J.S., Clark, M.L., Humphreys, S.M., Macdonald, I.A., Matthews, D.R. et Frayn, K.N. (1996a). Effects of morning rise in cortisol concentration on regulation of lipolysis in subcutaneous adipose tissue. *American Journal of Physiology*, vol. 271, n° 6 Pt 1, p. E996-1002.
- Samra, J.S., Simpson, E.J., Clark, M.L., Forster, C.D., Humphreys, S.M., Macdonald, I.A. et Frayn, K.N. (1996b). Effects of epinephrine infusion on adipose tissue: interactions between blood flow and lipid metabolism. *American Journal of Physiology*, vol. 271, n° 5 Pt 1, p. E834-9.
- Siiteri, P.K. (1987). Adipose tissue as a source of hormones. *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 45, n° 1 Suppl, p. 277-282.

- Simonsen, L., Enevoldsen, L.H. et Bulow, J. (2003). Determination of adipose tissue blood flow with local ^{133}Xe clearance. Evaluation of a new labelling technique. *Clinical Physiology & Functional Imaging*, vol. 23, n° 6, p. 320-323.
- Steinberg, H.O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N. et Baron, A.D. (1994). Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 94, n° 3, p. 1172-1179.
- Steinberg, H.O., Tarshoby, M., Monestel, R., Hook, G., Cronin, J., Johnson, A., Bayazeed, B. et Baron, A.D. (1997). Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, n° 5, p. 1230-1239.
- Stevens, A. et Lowe, J. (2006). *Histologie humain*. 3e édition édition, Éditions Elsevier, 459 p.
- Summers, L.K., Samra, J.S. et Frayn, K.N. (1999). Impaired postprandial tissue regulation of blood flow in insulin resistance: a determinant of cardiovascular risk? *Atherosclerosis*, vol. 147, n° 1, p. 11-15.
- Summers, L.K., Samra, J.S., Humphreys, S.M., Morris, R.J. et Frayn, K.N. (1996). Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow: variation within and between subjects and relationship to obesity. *Clinical science*, vol. 91, n° 6, p. 679-683.
- Tanida, M., Iwashita, S., Ootsuka, Y., Terui, N. et Suzuki, M. (2000). Leptin injection into white adipose tissue elevates renal sympathetic nerve activity dose-dependently through the afferent nerves pathway in rats. *Neuroscience letters*, vol. 293, n° 2, p. 107-110.

- Virtanen, K.A., Peltoniemi, P., Marjamaki, P., Asola, M., Strindberg, L., Parkkola, R., Huupponen, R., Knuuti, J., Lonnroth, P. et Nuutila, P. (2001). Human adipose tissue glucose uptake determined using (18)F-fluoro-deoxy-glucose ((18)FFDG) and PET in combination with microdialysis. *Diabetologia*, vol. 44, n° 12, p. 2171-2179.
- Waki, M., Kral, J.G., Mazariegos, M., Wang, J., Pierson, R.N., Jr et Heymsfield, S.B. (1991). Relative expansion of extracellular fluid in obese vs. nonobese women. *American Journal of Physiology*, vol. 261, n° 2 Pt 1, p. E199-203.
- Watt, M.J. et Steinberg, G.R. (2008). Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochemical Journal*, vol. 414, p. 313-325.
- Weinstock, P.H., Levak-Frank, S., Hudgins, L.C., Radner, H., Friedman, J.M., Zechner, R. et Breslow, J.L. (1997). Lipoprotein lipase controls fatty acid entry into adipose tissue, but fat mass is preserved by endogenous synthesis in mice deficient in adipose tissue lipoprotein lipase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, n° 19, p. 10261-10266.
- Wheater, P.R., Young, B. et Heat, J.W. (2001). *Histologie fonctionnelle*. 4e édition édition, Paris, De Boeck Université, 413 p.
- Yeh, S.Y. et Peterson, R.E. (1965). Solubility of krypton and xenon in blood, protein solutions, tissue homogenates. *Journal of Applied Physiology*, vol. 20, p. 1041-1047.
- Yki-Jarvinen, H. et Utriainen, T. (1998). Insulin-induced vasodilatation: physiology or pharmacology?[see comment]. *Diabetologia*, vol. 41, n° 4, p. 369-379.

Youngstrom, T.G. et Bartness, T.J. (1995). Catecholaminergic innervation of white adipose tissue in Siberian hamsters. *American Journal of Physiology*, vol. 268, n° 3 Pt 2, p. R744-51.

Yudkin, J.S. (2007). Inflammation, obesity, and the metabolic syndrome. *Hormone & Metabolic Research*, vol. 39, n° 10, p. 707-709.

ANNEXE
PROPOSITION DE PROTOCOLE DE RECHERCHE

Research proposal

A NEW FACET OF THE INCRETIN EFFECT: POST PRANDIAL REGULATION OF BLOOD FLOW IN ADIPOSE TISSUE

by

Élizabeth Martin, BSc and Jean-Luc Ardilouze, MD, PhD

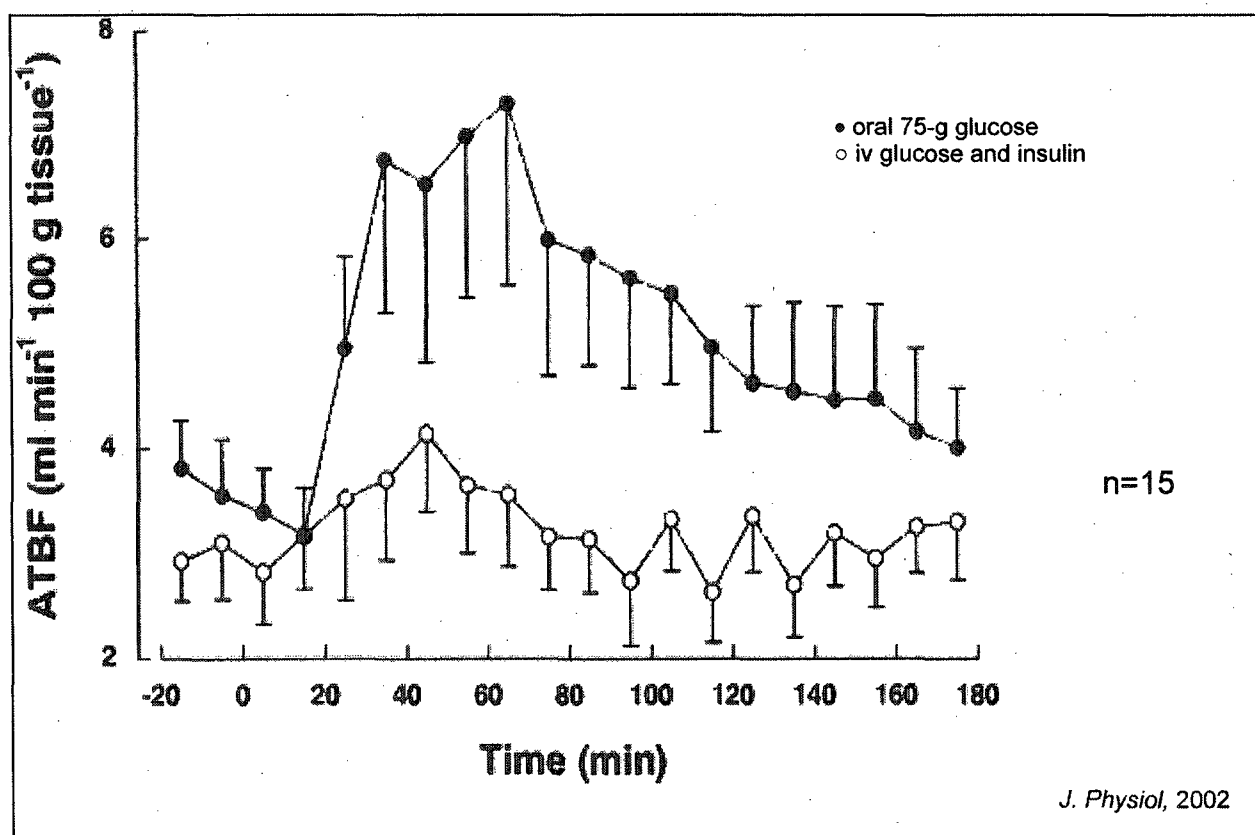


Figure 1. The incretin effect on postprandial regulation of adipose tissue blood flow (ATBF) in 15 healthy subjects. ATBF increased by 113% ($p < 0.05$) after oral absorption of 75-g of glucose at time 0, although similar plasma concentrations of insulin and glucose (achieved by dynamic intravenous infusions of glucose and insulin) resulted in lower effect (+50%, $p < 0.05$).

► BACKGROUND

1) Importance of blood flow in adipose tissue – Relation with the insulin resistance syndrome

Energy storage and disposal as well as secretion of hormones and adipocytokines require a precise regulation of blood flow in adipose tissue (ATBF).¹ It was well established²⁻⁷ that in obese and/or insulin-resistant individuals, fasting ATBF is lower than in healthy normal-weight subjects whereas the increase in postprandial ATBF is blunted i.e. ATBF enhancement peaks by less than 50% above baseline blood flow. Accordingly, we hypothesized that ATBF dysregulation is a component of insulin-resistance syndrome.⁸

2) A novel technique of investigation

The regulation of ATBF is not fully understood. In order to explore that regulation, we set-up⁸ and established recently in Sherbrooke a new technique of investigation, the “adipose tissue microinfusion (ATM)” technique,⁹ which allows accurate and quantitative measurements of the effects of vasoactive hormonal or pharmacological agents on ATBF. Briefly, ATM is based on the ¹³³xenon washout technique which is the gold standard for ATBF recording; an infusion of vasoactive substance (or saline for control in the same subject) is made directly into the exact location into which ¹³³xenon has been deposited, allowing the recording of ¹³³xenon disappearance e.g. ATBF, in relation to changes in local tissue infusion. The subcutaneous abdominal adipose tissue of the anterior abdominal wall is the anatomical site of investigation because of its relevancy and easy accessibility. We have four detectors available, and then four sites can be microinfused. Right and left sides, at the upper or lower level of the abdomen, are studied simultaneously to allow direct comparison of the effect of the vasoactive substance on one side with the contralateral saline control side on the other. *Each subject acts as his own control.* This design has been chosen because we have previously demonstrated that there is no fasting or postprandial ATBF difference between the right and the left side of the abdomen.¹⁰

3) Assessment of ATBF regulating factors using the ATM technique

Using the ATM technique, we provided evidence that, in adipose tissue, insulin *per se* has no vasodilatory effect, in the resting state as well as during the postprandial period.⁸ Consequently, we hypothesised that insulin may act indirectly on ATBF *via* sympathetic activation, and that nitric oxide (NO) may be an overall major regulator of ATBF. Indeed, fasting ATBF is primarily under NO tone¹¹ and circulating Ang II¹² and to some extent under α -adrenergic control, although the postprandial enhancement of ATBF is independent of NO and is controlled principally by the β -adrenergic system but for only 60%.¹¹ This suggests that the postprandial regulation of ATBF is complex and may involve the gastro intestinal tract.

► OUR LAB GENERAL WORKING HYPOTHESES

1) Increase in ATBF (i.e. vasodilatation), is associated with a) plasma TG and FFA extraction (for storage in adipocytes) during the postprandial period and b) NEFA release during postabsorptive state and fasting. In other words, a reduced ATBF, as seen in obese subjects, in patients with type 2 diabetes and, more recently in normal-weight subjects with

familial history of diabetes and cardiometabolic diseases but no insulin resistance,³ may lead to decreased plasma TG and FFA extraction, resulting in postprandial hyperlipidemia;

2) This defect in fat storage in adipose tissue, in turn, increases fat storage in other deposit sites such as liver or muscle, which is predisposing condition to insulin resistance, diabetes and cardiovascular diseases.

► RATIONAL OF THE PRESENT STUDY

Little is known regarding gut hormones and ATBF. The physiological increase in ATBF after a meal could be compared to the increase in intestinal blood flow. Splanchnic blood flow also increases sharply in response to oral but not intravenous glucose.¹³ We showed (figure 1) that an increase in ATBF is more significant after a 75-g glucose oral ingestion than after intravenous glucose and insulin infusions needed to obtain the same plasma glucose and insulin levels.⁸ These data add strong evidence to the potential role of the gastrointestinal tract on ATBF.

Incretins could be important factors. An obvious candidate is glucagon-like-peptide-1 (GLP-1). GLP-1 is the most important incretin in humans.^{14,15} GLP-1 receptors have been detected in adipose tissue. GLP-1 is secreted throughout the day and in increased amounts after meals. From baseline, GLP-1 increases by 120% after glucose load.¹⁶ Also, GLP-1 is a vasodilator in hepatic and pulmonary arteries.^{17,18} As β -adrenoceptor subtypes, his receptor belongs to the superfamily of seven transmembrane domain G protein-coupled receptors that positively regulate intracellular cAMP levels via adenylate cyclase.¹⁹

One study was performed in humans to test directly whether GLP-1 has actions on lipolysis in adipose tissue and was inconclusive, probably because the ethanol escape technique under microdialysis condition was used.¹⁹ This technique only gives an estimation of ATBF, it is an indirect and a non-quantitative method. When compared to ¹³³Xe washout technique,²⁰ the decrease in ethanol ratio was delayed (approximately 40 min.) in comparison with the increase in ATBF elicited by the ingestion of glucose. The method is either not sufficiently sensitive, or sufficiently rapid, to respond to the subsequent postprandial decrease in ATBF: when ATBF recorded by ¹³³Xe had shown, following a postprandial sharp increase, a sharp decline, the ethanol ratio showed no tendency to return to baseline.²⁰

In summary, several lines of evidence suggest that the gastrointestinal tract may be involved in the regulation of ATBF. We propose to first evaluate the role of GLP-1, although the role of other intestinal hormones in regulating ATBF after glucose or mixed meals remains to be established.

► **HYPOTHESIS OF THIS STUDY: GLP-1 has a vasodilator impact on postprandial ATBF regulation.**

► OBJECTIVES

To assess the effect on ATBF of GLP-1 [7-36] (the major form of circulating GLP-1), exendin [9-39] (an antagonist of GLP-1R) and sitagliptin (a DPP-IV inhibitor).

► RESEARCH PLAN

- Experiments with ATBF hypothetic stimulating agents: assessment of ATBF responses to GLP-1 [7-36] and DPP-IV inhibitor sitagliptin.

Experimental protocols. The ATM technique will be used for quantification of ATBF responses to 3 consecutive concentrations (10^{-5} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M) which are those used in our previous experiments.^{3,8,12} After baseline ATBF recording, at one upper and one lower site chosen by blocked randomisation (during each experiment, the 2 agents will be tested in the same subject), the lowest concentration (10^{-5}) of agents will be micro-perfused for 40 min. at an infusion rate of $2 \mu\text{l min}^{-1}$. Thereafter, at the same active sites, concentrations will be successively increased for two 40 min. periods. At the contralateral control sites, the saline infusion will be continued until the end of the experiment.

Subjects - Samples size. Given that no accurate data are available in literature and according to our previous experience, a minimum of 12 healthy young non smoker subjects will be necessary to find a physiological (30 to 50 %) difference.

Experimental days = 12 (one experimental day per subject).

Variables of interest. As previously, we will compare means in ATBF iAUCs and ATBF peak-baseline ratios, between tested and controlled sides.

Expected findings. We will show that GLP-1 and sitagliptin have a vasodilatator effect in subcutaneous adipose tissue.

- Experiments with blocker (exendin [9-39]).

The blocking principle. The so-called ‘blocking principle’ used in the present study is based on a straightforward idea. Assuming that the optimal ATBF increase is obtained during a physiological stimulus, blockade of the putative mediator of the response, when compared to a control, will assess the effect of the particular pathway. Accordingly, GLP-1 antagonist exendin [9-39] will be microinfused to evaluate the endogenous ATBF regulation before and after oral glucose intake.

Dose-response experiments will be performed beforehand.

■ Six concentrations of exendin [9-39] need to be tested since exendin has not been used under microinfusion or microdialysis conditions and therefore no “blocking” dosage indication is available. Chosen concentrations (10^{-5} M, 10^{-4} M and 10^{-3} M) and design of the present studies are those used in our previous experiments,^{3,8,12} although exendin will be additionally tested at low concentrations (10^{-6} M, 10^{-7} M, and 10^{-8} M) because highest concentrations could be in the partial agonist range.

■ Our previous dose-response studies have shown that 5 subjects are sufficient to determine optimal concentrations. Subjects will be challenged with 75-g glucose for endogenous stimulation of ATBF.

■ Three out of the four microinfusion sites will be randomly infused with one of three concentrations, with the fourth being a saline control site. Concentrations will be also randomly allocated.

- Experimental days = 10 (each subject will participate in 2 studies).

Final experimental protocol. After the optimal concentration is determined, 7 additional experiments will be performed for a total of 12 assessments of the optimal dose.

Variables of interest. As previously, we will compare means in ATBF iAUCs and ATBF peak-baseline ratios, between tested and controlled sides.

Expected findings. We will show that exendin [9-39] reduces by 30 to 40% the postprandial increase of ATBF.

► EXPECTED OUTCOMES OF THIS RESEARCH PROGRAM

1) Additional knowledge

If our *present hypothesis* is right, these studies will demonstrate that the incretin effect is complementary to the ATBF postprandial stimulatory adrenergic activity.

2) Promising upshot for sitagliptin

From a therapeutic prospective, the present studies will also support the utilization of inhibitors of DPP-4 such as Januvia. Indeed, these studies will demonstrate that DPP-4 inhibitors restore a lost function e.g. improve postprandial ATBF.

This in turn will suggest, in line with the *general working hypotheses of our lab*, that this class of drug may improve fat storage. Therefore, similar studies will be required to explore the ATBF-related mechanisms of hyperlipemia in subjects with low fasting ATBF and abolished ATBF response to meal, these are subjects with obesity, prediabetes or type 2 diabetes. To our knowledge, the lipids issue has never been carefully and specifically addressed in published clinical trials assessing DPP-4 inhibitors. Some papers reported that treatment with sitagliptin led to statistically significant lipids profile improvements, although no convincing mechanism was proposed to explain these data.

Accordingly, the aim of forthcoming studies could be to show that DPP-4 inhibitors restore the normal postprandial doubling or tripling of ATBF in patients who have lost this characteristic and, in turn, improve the lipids profile. This could reveal a new mechanism of action of Januvia and lead to new clinical applications.

► CONCLUSION

The demonstration of the role of GLP-1 as a complement to the other mechanisms which interact in the regulation of ATBF could pave the way to new physiopathological hypotheses and new therapeutic indications of sitagliptin in obese patients with insulino-resistance syndrome or type 2 diabetes.

REFERENCES

1. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, *et al.* Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* Aug 2003;27(8):875-888.
2. Coppack SW, Evans RD, Fisher RM, *et al.* Adipose tissue metabolism in obesity: lipase action in vivo before and after a mixed meal. *Metabolism.* Mar 1992;41(3):264-272.
3. **Ardilouze J-L**, Fielding B, Frayn K, *et al.* Failure to increase postprandial adipose tissue blood flow is associated with tissue resistance to adrenergic activation. *Obes Res.* 2005;Submitted.
4. **Ardilouze JL**. Regulation of adipose tissue blood flow in humans. PhD thesis. *University of Oxford.* 2004:1-251.
5. Bulow J, Astrup A, Christensen NJ, *et al.* Blood flow in skin, subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in the forearm of normal man during an oral glucose load. *Acta Physiol Scand.* 1987;130(4):657-661.
6. Jansson PA, Larsson A, Lonnroth PN. Relationship between blood pressure, metabolic variables and blood flow in obese subjects with or without non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 1998;28(10):813-818.
7. Blaak EE, van Baak MA, Kemerink GJ, *et al.* Beta-adrenergic stimulation and abdominal subcutaneous fat blood flow in lean, obese, and reduced-obese subjects. *Metabolism.* 1995;44(2):183-187.
8. Karpe F, Fielding BA, **Ardilouze JL**, *et al.* Effects of insulin on adipose tissue blood flow in man. *J Physiol.* May 1 2002;540(Pt 3):1087-1093.
9. Martin E, Brassard P, **Ardilouze JL**. A new technique to investigate adipose tissue metabolism. Submitted to *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.
10. **Ardilouze JL**, Karpe F, Currie JM, Frayn KN, Fielding BA. Subcutaneous adipose tissue blood flow varies between superior and inferior levels of the anterior abdominal wall. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2004;28:228-233.
11. **Ardilouze JL**, Fielding BA, Currie JM, *et al.* Nitric oxide and beta-adrenergic stimulation are major regulators of preprandial and postprandial subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. *Circulation.* Jan 6 2004;109(1):47-52.
12. Goossens GH, McQuaid SE, *et al.* Angiotensin II: a major regulator of subcutaneous adipose tissue blood flow in humans. *J Physiol.* 2006, 571, pt2, 451-460.
13. Brundin T, Branstrom R, Wahren J. Effects of oral vs. i.v. glucose administration on splanchnic and extrasplanchnic O₂ uptake and blood flow. *Am J Physiol.* 1996;271:E496-504.
14. Ahren B. Gut peptides and type 2 diabetes mellitus treatment. *Curr Diab Rep.* 2003; 3: 365-372.
15. Meier JJ, Gallwitz B, Schmidt WE, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 as a regulator of food intake and body weight: therapeutic perspectives. *Eur J Pharmacol.* 2002; 440: 269-279.
16. Rask E, Olsson T, Soderberg S, Holst Jj J, Tura A, Pacini G, Ahren B. Insulin secretion and incretin hormones after oral glucose in non-obese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism.* 2004;53:624-631.
17. Nishizawa M, Moore MC, Shiota M, Gustavson SM, Snead WL, Neal DW, Cherrington AD. Effect of intraportal glucagon-like peptide-1 on glucose metabolism in conscious dogs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284:E1027-1036.

18. Golpon HA, Puechner A, Welte T, Wichert PV, Feddersen CO. Vasorelaxant effect of glucagon-like peptide-(7-36)amide and amylin on the pulmonary circulation of the rat. *Regul Pept.* 2001;102:81-86.
19. Bertin E, Arner P, Bolinder J, Hagstrom-Toft E. Action of glucagon and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 1229-1234.
20. Karpe F, Fielding BA, Ilic V, Humphreys SM, Frayn KN. Monitoring adipose tissue blood flow in man: a comparison between the ^{133}Xe washout method and microdialysis. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:1-5.